

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Nachweis und Analyse der Interaktion von Sprouty-
Proteinen mit adenoviralen
E1A-Onkoproteinen**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Angelika Zaremba
aus Bottrop

November 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen-Duisburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. D. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2008

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	IV
1.	Einleitung	1
1.1	Adenoviren	1
1.1.1	Die produktive Infektion	3
1.1.2	Die abortive Infektion	5
1.2	Die adenoviralen E1A-Proteine	5
1.2.1	RNAs und Proteine der E1A-Region des onkogenen Adenovirus-Serotyps 12	6
1.2.2	Funktion der E1A-Proteine	7
1.2.3	Transformation durch Adenoviren	9
1.3	Die Sprouty-Proteine	12
1.3.1	Die Funktion von Sprouty 1	17
1.3.2	Das Potential der Sprouty-Proteine als Tumorsuppressoren	18
1.4	Ziel der Arbeit	19
2.	Material	20
2.1	Chemikalien	20
2.2	Enzyme	21
2.3	Oligonukleotide	22
2.4	Plasmide	23
2.5	Antikörper	25
2.6	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	26
2.7	Puffer und Lösungen	27
2.8	Bakterienstämme	30
2.9	Zelllinien	31
2.10	Molekulargewichtstandards	31
2.11	Reaktions- und Nachweis-„Kits“ und spezielle Reagenzien	31
2.12	Filme, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	32
2.13	Spezielle Laborgeräte	33
3.	Methoden	34
3.1	Allgemeine Methoden	34
3.2	Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren	34

3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis <i>et al.</i> , 1986)	34
3.3	Zellkultur	35
3.4	Transfektion eukaryontischer Zellen	35
3.4.1	Elektroporation	36
3.4.2	Lipofektion	36
3.5	Analyse von Proteinen	37
3.5.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen	37
3.5.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	37
3.5.3	GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen	38
3.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.5.5	Western Blot	39
3.5.6	Luciferase Reporter Assay	40
3.5.7	Immunpräzipitation	40
3.5.8	Immunfluoreszenz	41
4.	Ergebnisse	43
4.1	Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine mit den zellulären Sprouty-Proteinen	43
4.1.1	Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine des Serotyps 12 mit Sprouty-Proteinen und Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen <i>in vitro</i>	44
4.1.2	Das E1A _{13S} -Protein des Adenovirus-Serotyps 2 interagiert mit Sprouty 1 <i>in vitro</i>	48
4.1.3	Das E1A _{12S} -Protein des Adenovirus-Serotyps 12 interagiert mit Sprouty 1 <i>in vivo</i>	50
4.2	Die Spred-Proteine 1 und 2 interagieren nicht mit den E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12	51
4.3	Das E7-Protein des humanen Papillomavirustyp 16 interagiert mit Sprouty 1	53
4.4	Sprouty 1 kolokalisiert mit E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 im Zytoplasma	54
4.5	Analyse funktioneller Konsequenzen der Interaktion von E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1	60
4.5.1	Sprouty 1 hemmt die E1A _{13S} -induzierte Aktivierung des TPA- <i>responsive element</i> (TRE)	60

4.5.2	Die E1A _{13S} -induzierte Aktivierung des <i>serum reponse element</i> (SRE) wird durch Sprouty 1 inhibiert	63
4.5.3	Die Phosphorylierungen der MAP-Kinasen ERK1/2 (p42/ p44) werden durch E1A _{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 und Sprouty 1 modifiziert	72
5.	Diskussion	75
5.1	Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine mit den zellulären Sprouty-Proteinen	76
5.2	Kolokalisationsnachweis von E1A _{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1	80
5.3	Die E1A _{13S} -Transaktivierung des TRE wird durch Sprouty 1 inhibiert	81
5.4	Die E1A _{13S} -induzierte Aktivierung des SRE über den FGFR-Signalweg wird durch Sprouty 1 inhibiert	83
6.	Zusammenfassung und Ausblick	90
7.	Literaturverzeichnis	92
8.	Eigene Publikationen	104
9.	Lebenslauf	105
10.	Erklärungen	106

II Abkürzungen

A	Ampere
A.	Aqua
aa	"aminonacid" (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATF2	"Activating Transcription Faktor-2"
bar	Einheit des Druckes
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bidest.	zweifach destilliert
bp	"basepair" (Basenpaar)
BSA	"Bovine Serum Albumin" (Rinder Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAR	Coxsackievirus Adenovirus Rezeptor
CBP	"Cap Binding Protein"
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
°C	Grad Celcius
CR	Conserved Regions (konservierte Regionen)
CRE	"cAMP-Responsive-Element"
CREB	"cAMP-Responsive-Element Binding Protein"
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DMEM	Dulbeccos Modifikation des Mediums nach Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
E2F	Transkriptionsfaktor 2
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ERK	Extracellular-regulated kinases
EGFR	Epidermaler Wachstumfaktor Rezeptor
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAP	"GTPase Activating Protein"
Grb2	"Growth factor receptor bound protein 2"
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
l	Liter
LB	Luria-Bertania
M	Molarität (mol/l)
MHC	"Major Histocompatibility Complex" (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MEK	"Mitogen Activated Protein Kinase/ERK Kinase"
min	Minute
mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	"messenger RNA" (Boten-RNA)
ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"Phosphate-Buffered-Saline" (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	pH-Wert ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
pRB	Retinoblastom Protein
mol	Mol (Stoffmenge)
RIá, RIIá	Regulatorische Untereinheiten
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	"Son-of-Sevenless"
Spry	Sprouty
SRE	<i>serum response element</i>
Tab.	Tabelle
TBS	"Tris-Buffered-Saline" (trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRE	<i>TPA-responsive element</i>
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1 U = 1 mol/min)
V	Volt
VT	Versen-Trypsin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($1 \times g = 9,81 \times \text{m/s}^2$)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

In dieser Arbeit benutzte Vorsätze zur Angabe der Zehnerpotenz, mit der die Maßeinheit zu multiplizieren ist:

T	Tera	$= 10^{12}$
G	Giga	$= 10^9$
k	Kilo	$= 10^3$
c	Zenti	$= 10^{-2}$
m	Milli	$= 10^{-3}$
μ	Mikro	$= 10^{-6}$
p	Piko	$= 10^{-12}$

1. Einleitung

Animale Viren sind obligate intrazelluläre Parasiten. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und können sich erst in einer passenden Wirtszelle mit Hilfe des enzymatischen Apparates der infizierten Zelle vermehren. Einige der animalen Viren sind in der Lage, ihre Wirtszellen zu Tumorzellen zu transformieren.

Die Studien von Virus-Wirtszell-Systemen ermöglichen wichtige Einblicke in die Regulation von zellphysiologischen Vorgängen wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose, die für das Verständnis von molekularen Prozessen in Eukaryontenzellen entscheidend sind. So wurden z. B. das Spleißen von RNA (Berk and Sharp, 1978) und das Verpacken von DNA mit Histonen in Nukleosomen an Virusmodellen identifiziert (Gariglio *et al.*, 1979). Seit der Entdeckung der tumorigenen Eigenschaft spezifischer Adenovirus-Serotypen wird das Adenovirus/Zell-System als Modellsystem zum Studium der virusinduzierten Transformation genutzt. Die Zelltransformation durch Adenoviren ist die Folge der Funktion mehrerer Genprodukte der zwei frühen viralen Regionen E1A und E1B.

Die E1A-Proteine agieren vor allem als Regulatorproteine (Transaktivatoren, Repressoren), die nicht nur die Expression viraler, sondern auch die spezifischer zellulärer Gene modulieren. Die Untersuchungen der Wirkungsweise adenoviraler E1A-Onkoproteine tragen daher zur Aufklärung zellulärer Regulationsmechanismen bei, die im Weiteren für das Verständnis molekularer Vorgänge während der Zelltransformation essentiell sein können.

1.1 Adenoviren

Die Familie der Adenoviridae lässt sich in die vier Genera *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* und *Atadenovirus* einteilen. Die *Mastadenoviren* umfassen die verschiedenen Virusspezies der Säugetiere und die *Aviadenoviren* die der Vögel. Aufgrund molekularbiologischer und struktureller Unterschiede wurden die beiden Genera *Siadenovirus* und *Atadenovirus* definiert, welche Virusspezies der Säugetiere, Vögel, Fische und Reptilien umfassen (Benko *et al.*, 2005).

1953 isolierten Wallace Rowe und seine Mitarbeiter erstmals aus Tonsillen und adenoidem Gewebe Adenoviren und vermehrten sie in Zellkultur (Rowe *et al.*, 1953). Heute sind über 50 verschiedene humane Adenovirus-Serotypen beschrieben. Sie verursachen meist milde Infektionen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes oder der Bindehaut des Auges (zur Übersicht siehe Horwitz, 1990). Die humanen Adenoviren werden nach unterschiedlichen Kriterien, wie DNA-Sequenzhomologie, Hämagglutinations-Reaktion mit Ratten- und Rhesusaffenerythrozyten, dem Ausmaß ihrer Onkogenität in Nagetieren und der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions, in sechs Subgenera (A bis F) eingeteilt (als Übersicht siehe Bailey und Mautner, 1994). Obwohl die humanpathogenen Adenoviren der Subgenera A und B in Nagetieren Tumore hervorrufen können, wurde bisher kein kausaler Zusammenhang zwischen adenoviraler Infektionen und der Entstehung von menschlichen Tumoren nachgewiesen.

Das Virion des Adenovirus ist nicht membranumschlossen, hat eine ikosaedrisch geformte Struktur und weist einen Durchmesser von 80 bis 110 nm auf. Das Capsid wird aus 240 Hexon- und zwölf Pentoncapsomeren aufgebaut. Das Virus-Genom besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA mit einer Länge von 36 – 38 kbp (als Übersicht siehe Flint und Bruker, 1981; Rux und Burnett, 2004). Die Pentoncapsomere setzen sich aus einem Pentonbasis- und einem Fiberproteinanteil zusammen. Durch die Fiberproteine wird die Absorption des Virus an spezifische Rezeptoren der Zielzelle vermittelt. Der bis jetzt am besten untersuchte Fiber-Rezeptor ist der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR). CAR gehört zur Immunglobulinfamilie und vermittelt unter anderem die Zelladhäsion. Als weitere Fiber-Rezeptoren sind CD46, CD80 und CD86 sowie einige Integrine bekannt (Zhang und Bergelson, 2005). Über Rezeptor-vermittelte Endozytose dringt das Adenovirus durch die Interaktion der Penton-Proteine mit einem Rezeptor der α V-Integrin-Rezeptor-Familie an Clathrin-reichen Regionen in die Zellen ein. Die Ansäuerung des Milieus in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung der Virionhülle, die die Zerstörung der frühen endosomalen Membran einleitet und zur Freisetzung des teilweise enthüllten Virions führt (Greber *et al.*, 1993). Vermutlich gelangen die Virionen nach Eintritt in das Zytoplasma über eine Interaktion der Hexoncapsomere mit den Mikrotubuli zu den Kernporen (Pastan *et al.*, 1987). Durch die Assoziation des Virus an die Kernmembran wird die komplexierte Virus-DNA in den Zellkern importiert und die verbleibende Virushülle abgebaut (Greber *et al.*, 1993). Als Interaktionsprotein für den Import in den Zellkern wurden für die Ad2-Capside das

„Nuclear Pore Complex“ Protein CAN/Nup214 identifiziert. Im Weiteren wichtig für die Freisetzung der Virus-DNA sind die Interaktion von Histon H1 und H1-Importfaktoren mit dem Viruscapsid (Trotman *et al.*, 2001).

Nach Infektion mit humanpathogenen Adenoviren bestehen in Abhängigkeit von der Wirtszelle zwei mögliche Formen des Infektionsverlaufes: die **produktive Infektion** und die **abortive Infektion**.

1.1.1 Die produktive Infektion

Bei der produktiven Infektion finden in der Wirtszelle die virale Genom-Replikation und der Zusammenbau der viralen Nachkommen statt. Im Anschluss erfolgt die Zell-Lyse und somit die Freisetzung der viralen Nachkommen.

Nach Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern findet die Expression der viralen Gene statt, die entsprechend dem zeitlichen Beginn ihrer Expression in frühe (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4) und späte (L1-L5) Gene unterteilt werden (Abb. 1; Broker *et al.*, 1984).

In der „frühen Genexpression“ werden die Genprodukte der Regionen E1-E4 exprimiert. Da DNA-Tumoviren in den meisten Fällen ausdifferenzierte, teilungsinaktive Zellen infizieren, ist es eine der Hauptfunktionen dieser Genprodukte die Zelle in einen teilungsaktiven Zustand zu überführen, damit die Virusreplikation und die Synthese weiterer viraler Genprodukte stattfinden kann. Die Gene der E1-Gruppe werden als erste transkribiert (immediate early genes) und sind für den weiteren Verlauf der Infektion entscheidend. Durch die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren beeinflussen die E1A-Proteine die Genexpression der adenoviralen sowie der zellulären Gene (siehe Brockmann und Esche, 1995; Gallimore und Turnell, 2001). Die Proteine der E1B-Region sind unter anderem für die Akkumulation, die Stabilisierung, den Transport und die selektive Expression viraler mRNA verantwortlich (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1995; Gabler *et al.*, 1998). Im Weiteren inhibieren die E1B-Proteine die TNF α -induzierte Apoptose (Gooding *et al.*, 1991; White *et al.*, 1992). Die Produkte der E2-Gene sind für die Replikation der viralen DNA entscheidend. Hierbei handelt es sich um ein DNA-Bindeprotein, eine virale DNA-Polymerase und das terminale Protein (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die genetische Information in der E3-Region kodiert für etliche Proteine, die

unter anderem der Immunantwort des Wirtsorganismus entgegenwirken. Sie verhindern z. B. den Transport von MHC-Klasse-I-Antigenen an die Zellmembran (Burgert *et al.*, 1987) und die TNF- α vermittelte Einleitung der Apoptose (Gooding *et al.*, 1988). Die E4-Proteine sind an der Regulation der viralen und zellulären Genexpression sowie am Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt. Weiterhin regulieren sie in Kooperation mit den E1B-Proteinen die selektive Akkumulation viraler RNA (Shenk, 1996).

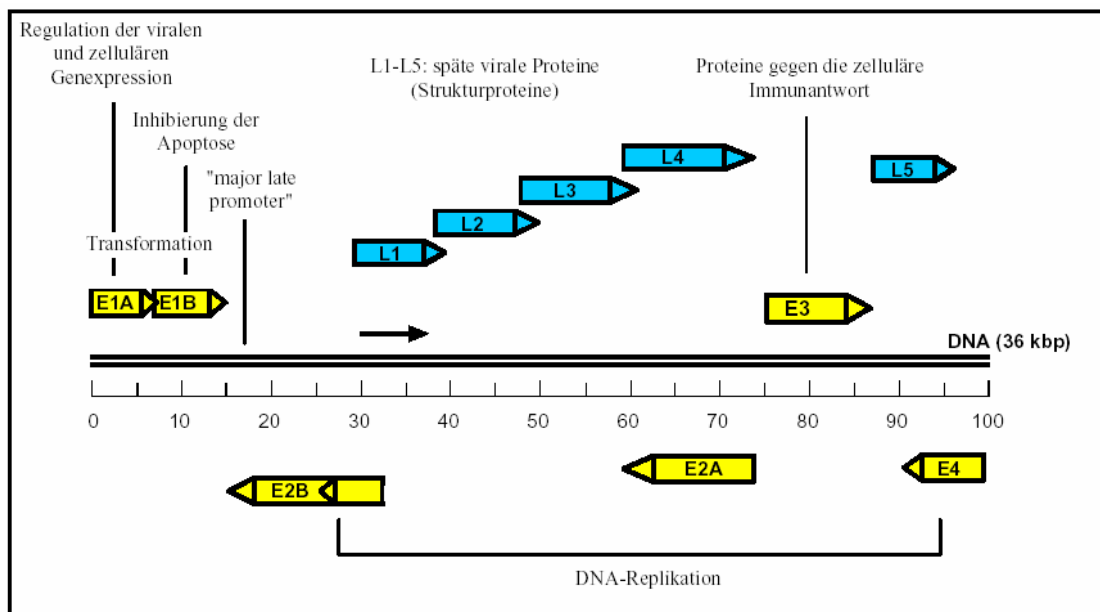


Abb. 1 Schematische Darstellung der Genomorganisation humanpathogener Adenoviren (nach Watson *et al.*, 1987). Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird hier in „map units“ (1-100) unterteilt. Die frühen Transkriptionseinheiten (E = early; E1-E4) werden jeweils durch einen eigenen Promotor reguliert. Die späten Regionen L1-L5 (L = late) stehen unter der Kontrolle eines einzigen Promotors, des „major late promoters“. Wichtige Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind der jeweiligen Region zugeordnet.

Die Proteine der späten Phase, deren Expression etwa 6-8 h nach Infektion der Zelle eingeleitet wird, sind fast ausnahmslos Strukturproteine. Aus einer Vorläufer-RNA werden durch alternatives Spleißen mehr als 20 mRNAs prozessiert. Diese werden in die fünf Familien L1 bis L5 eingeteilt und kodieren für virale Strukturproteine oder deren Vorläufer (siehe Flint und Broker, 1981). Der Zusammenbau der infektiösen Virionen findet im Zellkern statt. Die Zell-Lyse und die Freisetzung der Nachkommenviren werden unter Beteiligung des E3-ADP (adenovirus death protein) eingeleitet (Tollefson *et al.*, 1996).

1.1.2 Die abortive Infektion

Die Infektion humanpathogener Adenoviren in nicht-permissiven Zellen führt zu einer abortiven Infektion. Hierbei gelangt das Virus zwar in die Zelle und die frühe Genexpression kann eingeleitet werden, jedoch ist die virale DNA-Replikation bzw. die Expression der späten Regionen gestört. In diesen Zellen können keine infektiösen Virionen gebildet werden (Doerfler, 1969; Esche *et al.*, 1979; Esche und Siegmann, 1982). In 10^{-6} bis 10^{-5} Fällen kann die abortive Infektion durch vollständige oder partielle Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom und die Expression der viralen Genprodukte E1A und E1B zur Transformation der infizierten Zelle führen (van der Eb und Bernards, 1984). Alle Adenoviren (Subgenus A bis F) sind in der Lage *in vitro* Nagetierzellen zu transformieren, jedoch rufen nur die Adenovirustypen, die zu dem hochonkogenen Subgenus A (Ad12, Ad18 und Ad31) und dem schwach onkogenen Subgenus B (Ad3, Ad7 und Ad11) gehören, in immunkompetenten Nagetieren Tumore hervor. Durch den Grad ihrer tumorigenen Eigenschaft in Nagetieren werden die Adenoviren in nicht onkogene und onkogene Serotypen unterteilt (Wadell, 1984). Für die Zelltransformation sind die viralen Proteine, die von der E1-Region der „immediate early genes“ kodiert werden, notwendig. Weitere Untersuchungen mit chimären Adenoviren haben gezeigt, dass die tumorigene Eigenschaft der Adenovirus-Serotypen von der E1A-Region bestimmt wird (van der Eb *et al.*, 1977; Bernards *et al.*, 1983; van der Eb und Bernards, 1984).

1.2 Die adenoviralen E1A-Proteine

Die E1A-Proteine werden nach Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern als erste exprimiert und sind für die Aktivierung der Expression weiterer adenoviraler Transkriptionseinheiten essentiell sowie zur Aktivierung der Expression einer Reihe von zellulären Genen notwendig (Berk, 1986). Über eine Kernlokalisationssequenz translozieren die E1A-Proteine nach der Synthese in den Zellkern. Da E1A-Proteine keine intrinsische sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität aufweisen, beeinflussen sie die Transkription zellulärer und viraler Gene über die Wechselwirkung mit Wirtsproteinen. Die E1A-abhängige Aktivierung der viralen und zellulären

Transkription führt in der Regel zur Einleitung der S-Phase, die für den viralen Entwicklungszyklus essentiell ist. Madison und Mitarbeiter entdeckten, dass eine Acetylierung der viralen E1A-Proteine zum Verbleib dieser im Zytoplasma führt (Madison *et al.*, 2002). In den letzten Jahren konnten zytoplasmatisch lokalisierte Proteine identifiziert werden, die durch die Interaktion mit E1A-Proteinen zelluläre Vorgänge beeinflussen.

1.2.1 RNAs und Proteine der E1A-Region des onkogenen Adenovirus-Serotyps 12

Durch alternative Spleißprozesse entstehen aus einer hnRNA der E1A-Region des hoch-onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 sechs verschiedene mRNAs. Entsprechend ihrer Sedimentationskoeffizienten werden diese als 13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S bezeichnet und kodieren für die fünf Proteine Ad12-E1A_{13S}, (266R), Ad12-E1A_{12S} (235R), Ad12-E1A_{10S/11S} (106R), Ad12-E1A_{9,5S} (52R) und Ad12-E1A_{9S} (53R) (vgl. Abb. 2; Sawada und Fujinga, 1980; Brockmann *et al.*, 2001). Durch Spleißvorgänge kommt es bei den 11S-, 10S-, 9,5S- und 9S-mRNAs zu einer Leserasterverschiebung, so dass nur der N-Terminus aller E1A-Proteine sequenzhomolog bleibt.

In allen E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 findet sich die gleiche aminoterminal Aminosäuresequenz, bestehend aus 29 Aminosäuren. Die beiden hauptsächlichen Genprodukte Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} bestehen aus 266 bzw. 235 Aminosäuren und unterscheiden sich lediglich durch das Fehlen eines internen Bereiches, bestehend aus 31 Aminosäuren, der CR3-Domäne im E1A_{12S}-Protein. Die konservierten Regionen finden sich in allen Serotypen wieder und werden als CR1-CR4 bezeichnet (Kimelman *et al.*, 1985; Avvakumov *et al.*, 2002). Der Aminoterminus und die konservierten Domänen der E1A-Proteine beinhalten die meisten transkriptionsregulierenden Funktionen, die für den viralen Entwicklungszyklus notwendig sind (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Zwischen der CR2- und CR3-Domäne liegt im Ad12-E1A-Protein eine 20 Aminosäuren umfassende Sequenz, der sog. Spacer, die in der E1A-Region nicht onkogener Adenoviren fehlt. In Versuchen mit Spacermutanten ließ sich dieser Bereich im Tierversuch als eine der onkogenen Determinanten in Ad12-E1A identifizieren (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994). Im Weiteren finden sich zu den Genprodukten der 11S-, 10S- und

9,5S-mRNA aus onkogenen Viren keine äquivalenten Proteine in nicht-onkogenen Adenoviren. Da das Stopkodon in den 11S- und 10S-mRNAs vor der zweiten Spleißstelle liegt, wird in beiden Fällen ein identisches Protein (106R) exprimiert.

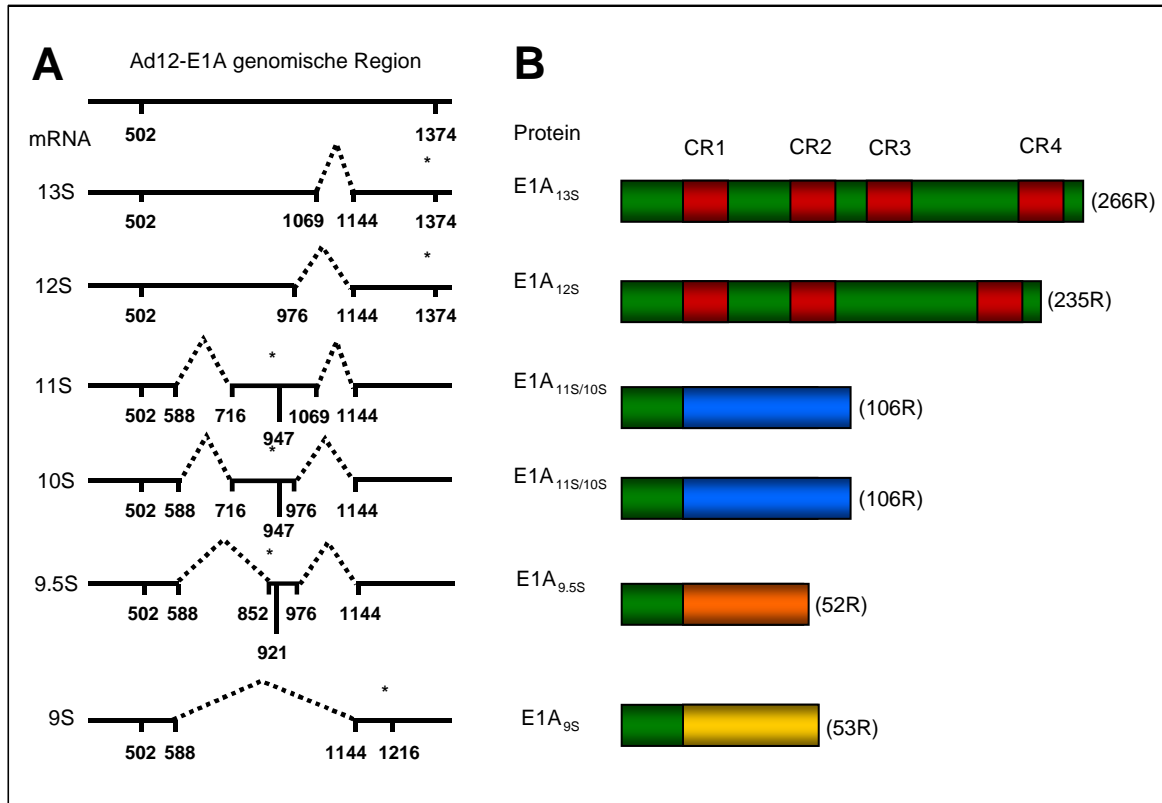


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ad12-E1A mRNAs (A) und Proteine (B) (nach Brockmann *et al.*, 2001). A) Die Zahlen unterhalb der Linien geben die Nukleotidposition innerhalb des Ad12-Genoms an. Die gestrichelten Linien weisen auf Introns hin und die „Sternchen“ markieren den Stopkodon-Bereich. B) Leserasterverschiebungen werden durch die veränderte Farbgebung angegeben. Die roten Rechtecke stellen die konservierten Regionen 1-4 (CR1, CR2, CR3, CR4) dar. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit.

1.2.2 Funktion der E1A-Proteine

Da E1A-Proteinen eine sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität fehlt (Ferguson *et al.*, 1985), interagieren sie mit zellulären Faktoren, um ihre transkriptionelle Funktion zu vermitteln. Am carboxyterminalen Ende der E1A_{13S}- und E1A_{12S}-Proteine befindet sich eine Kernlokalisationssequenz, wodurch die synthetisierten E1A-Proteine in den Zellkern translozieren (Lyons *et al.*, 1987). Unter den mit E1A interagierenden Wirtsproteinen finden sich sowohl generelle wie auch DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren. Hierzu zählen z. B. das TATA-Box-Bindungsprotein und der promotorgebundene cJun/ATF-2-Transkriptionsfaktorkomplex (Brockmann *et*

al., 1993; Duyndam *et al.*, 1996; Brockmann *et al.*, 2001). Im Weiteren sind als Interaktionspartner unter anderem Koaktivatoren (p300/CBP), Korepressoren (CtBP), Chromatin modulierende Faktoren (SWI/SNF) oder Mediatorkomplexe (Sur2, TAFs) bekannt (Bayley und Mymryk, 1994; Mymryk und Smith, 1997; Stevens *et al.*, 2002; siehe Übersicht Gallimore und Turnell, 2001).

Der N-Terminus, die konservierten Domänen CR1-CR4 sowie das Exon 2, das die Interaktionsdomäne für den zellulären Repressor CtBP beinhaltet, stellen Interaktions- und Aktivierungsdomänen dar. Die CR3-Region von E1A₁₃₅ fungiert z.B. als Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne (Jones, 1995).

Die gezielte Interaktion mit zellulären regulatorischen Proteinen führt zu einer transkriptionellen Veränderung, die für die virale Replikation und somit für den viralen Entwicklungszyklus essentiell ist. So führt z.B. die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren cJun und ATF-2 zu einer transkriptionellen Aktivierung des *cjun*-Promotors. Die steigende Expression von cJun beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse, wie z. B. Differenzierung und Proliferation (Liu und Green, 1990; Angel und Karin, 1991). Ein weiteres Eingreifen in den Zellzyklus wird durch die Interaktion über die CR1- und CR2-Domänen mit den Rb- (Retinoblastom) Proteinen p107 und p130 eingeleitet. Durch die Interaktion werden die transkriptionsaktiven E2F-Proteine, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, aus dem inhibitorischen Komplex mit pRb freigesetzt und initiieren so z.B. die Expression der Gene der Dihydrofolatreduktase oder der Thymidinkinase (Whyte *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1993).

Die Bindung zu zellulären Histon-Acetyltransferasen, wie z.B. zu p300 und p400, führt zur Veränderung des Acetylierungsmusters der basischen Lysin- und Argininreste der Histone, wodurch sich die Struktur des Histonkomplexes mit der DNA verändert und somit die Transkription beeinflusst wird (Arany *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 2001).

Die E1A-Proteine sind vor allem im Zellkern, in geringerer Konzentration jedoch auch im Zytoplasma lokalisiert. Die Lokalisation der E1A-Proteine wird im Zytoplasma durch die Acetylierung des Lysinrestes 239 beeinflusst. Die Acetylierung hemmt die Bindungsaffinität von E1A zum Importin- α 3-Protein des Kernporenkomplexes, was zu einem Verbleib von E1A im Zytoplasma führt (Madison *et al.*, 2002). Erst in den letzten Jahren wurden auch zytoplasmatisch lokalisierte Interaktionspartner identifiziert. Hierbei wurde z.B. eine Interaktion mit dem zellulären Protein Rack1 (Receptor for activated C-kinase 1) gefunden, für die eine inhibitorische

Wirkung der E1A-induzierten Apoptose gezeigt werden konnte. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch ungewiss (Sang *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004). Aus unserer Arbeitsgruppe konnten Fax und Mitarbeiter 2001 eine Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit RII α des PKA-Holoenzym und der damit verbundenen Translokation in den Zellkern nachweisen. Des Weiteren wurde eine sowohl im Zytoplasma wie auch im Zellkern identifizierte Assoziation von E1A mit dem 26S Proteasom entdeckt, wodurch die ATPase-Aktivität des Proteasoms beeinflusst wird. Es wird vermutet, dass die Funktion dieser Interaktion zwischen E1A und dem 26S Proteasom lokalisationsbedingt variiert (Turnell *et al.*, 2000).

Über die Funktion der niedermolekularen E1A-Proteine E1A_{11S}, E1A_{10S}, E1A_{9,5S} und E1A_{9S} ist nur sehr wenig bekannt. Für das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein konnte jedoch eine reprimierende Funktion für die cJun/Ap-1-abhängige Genexpression gezeigt werden (Brockmann *et al.*, 1993 ; Übersicht s. Brockmann *et al.*, 2001).

1.2.3 Transformation durch Adenoviren

Unabhängig von ihrer serotypischen Einteilung sind alle bekannten humanpathogenen Adenoviren in der Lage, nicht-permissive Zellen in Zellkultur zu transformieren und in immundefizienten Nagern (z. B. Nacktmäuse) die Bildung von Tumoren zu induzieren (als Übersicht siehe William *et al.*, 1995). Die virale Transformation lässt sich hierbei auf das onkogene Potential adenoviraler Genprodukte der folgenden frühen Regionen zurückführen:

Proteine der E1A-Region

Die konstitutive Expression der E1A- und E1B-Proteine kann zur zellulären Transformation führen. Die E1A-Proteine sind in der Lage Zellen zu immortalisieren, jedoch sind für die vollständige Transformation die Genprodukte der E1B-Region notwendig, durch die die E1A-induzierte Apoptose inhibiert wird (als Übersicht siehe White *et al.*, 1995). Die E1A vermittelte Zellzykluseinleitung kann in nicht-permissiven Zellen zur Immortalisierung führen. So führt die Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein pRb zur Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren aus inhibitorischen Komplexen mit pRb. Der freigesetzte aktive E2F-Transkriptionsfaktor aktiviert zusammen mit dem zellulären Faktor DP-1 zahlreiche, für das Durchlaufen der S-Phase notwendige Gene, wie z.B. der Dihydrofolatreduktase, der Thymidinkinase,

c-myc oder Zyklin-E (Moran, 1994; Slansky und Farnham, 1996; als Übersicht siehe Zhang und Dean, 2001). Weitere Bindungspartner von E1A_{13S} und E1A_{12S} sind p300 und CBP (CREB-Bindungs-Protein), zwei nahe miteinander verwandte Proteine mit Histon-Acetylaseaktivität. Die CBP/p300-Proteine kooperieren mit dem Anaphase Promoting Komplex (APC/C), eine E3 Ubiquitin Ligase, die den zeitlichen Ablauf der Zellteilung steuert (Turnell *et al.*, 2005). Während der Mitose reguliert das APC/C den Abbau des Proteins Securin, wodurch ein koordinierter Übergang von der Metaphase in die Anaphase eingeleitet wird. Im Weiteren reguliert es den Abbau von Cyclin-B1, wodurch der Mitoseaustritt und die Einleitung der G₁-Phase reguliert wird (Harper *et al.*, 2002; Peters, 2002). Es gibt Hinweise, dass die E1A-Proteine während der Transformation mit CBP/p300 interagieren, um die Zellteilung über das APC/C zu regulieren und somit der Eintritt in die S-Phase und der Übergang von der Metaphase in die Anaphase beeinflusst wird (Turnell und Mymryk, 2006). Die Interaktion mit einer weiteren Histonacetyltransferase, das Protein p400, nimmt ebenfalls Einfluss auf das E1A-Potential zur Transformation der Zelle. E1A-Mutanten, die nicht an p400 binden können, sind auch nicht mehr in der Lage, primäre Zellen zu transformieren (Fuchs *et al.*, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E1A stabilisierend auf das Tumorsuppressorprotein p53 wirkt, was vermutlich auch über die Interaktion mit p300 vermittelt wird (Debbas und White, 1993; Grossman *et al.*, 1998).

Die Fähigkeit einiger Adenoviren, die infizierten Zellen gegen die Eliminierung durch das Immunsystem des Wirtsorganismus zu schützen, ist für das virale onkogene Potential von entscheidender Bedeutung. Vasavada und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die E1A-Proteine des Adenovirus Serotyps 12 für die Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression verantwortlich sind (Vasavada *et al.*, 1986). In weiteren Untersuchungen von Zhao und Ricciardi konnte festgestellt werden, dass E1A_{13S} die Unterdrückung der MHC-Klasse-I-Expression über die Histondeacetylasen 1 und 8 vermittelt, wodurch die Chromatinstruktur verändert und die Genexpression beeinflusst wird (Zhao und Ricciardi, 2006). Die Reduzierung von MHC-Klasse-I-Antigenen auf der Zelloberfläche verringert das Risiko, dass die transformierte Zelle von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erkannt und zerstört wird.

Alle Adenovirus Serotypen sind in der Lage, *in vitro* Zellen morphologisch zu transformieren. Die Fähigkeit zur Onkogenität, d.h. die Fähigkeit, in immunkompetenten Nagern Tumore zu induzieren, ist dagegen abhängig vom Serotyp. Die Tumorigenität der Adenoviren lässt sich unter anderem auf einen 20 Aminosäuren umfassenden Spacer

der E1A-Proteine zurückführen. Dieser liegt bei dem hoch-onkogenen Adenovirus Serotyp 12 zwischen der CR2- und der CR3-Domäne und ist bei nicht-onkogenen Serotypen nicht vorhanden. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Länge dieses Spacers mit dem onkogenen Potential der Viren korreliert (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994). Ein weiterer Unterschied zwischen onkogenen und nicht-onkogenen Adenoviren ist die Expression der Splicevarianten E1A_{10S/11S} und E1A_{9,5S}, welche spezifische Genprodukte des hoch-onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass sie für die selektive Onkogenität mitverantwortlich sind, jedoch konnte bis heute kein eindeutiger Beleg dafür gefunden werden. Ein Hinweis darauf, dass Ad12-E1A_{9,5S} onkogenes Potential aufweist, ist sein inhibitorischer Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Promotoren durch cJun/AP-1-Transkriptionsfaktoren. Möglicherweise trägt Ad12-E1A_{9,5S} zur Suppression der MHC-Klasse-I-Expression bei, da die cJun/AP-1-abhängige Aktivierung des murinen MHC-Klasse-I-Promotors über ein AP-1-abhängiges Element im Enhancer A unterdrückt wird (Brockmann *et al.*, 1996).

Proteine der E1B-Region

Zur Transformation der Zelle ist die konstitutive Expression der E1B-Proteine oder die eines anderen kooperierenden Onkogens bzw. Protoonkogens, wie z.B. der aktivierten Form des Ras-Proteins oder Bcl-2, notwendig (Byrd *et al.*, 1988; Sabbatini *et al.*, 1995). Die Ad12-E1B-Region kodiert für ein 55 kDa und ein 19 kDa großes Protein. E1B-Proteine weisen keine transformierenden Eigenschaften auf, sind aber für die Ausbildung der vollständigen Transformation notwendig, da sie hauptsächlich die E1A-induzierte Apoptose inhibieren (Van den Elsen *et al.*, 1983; als Übersicht White, 1995). E1A induziert die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53, was zur Folge hätte, dass die Zelle in der G₁-Phase arretiert und der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Die E1B-Proteine inhibieren die p53-vermittelte Apoptose unter anderem durch die Aktivierung der Transkription des *mdm2* Gens, dessen Genprodukt ein Inhibitor von p53 ist (Debbas und White, 1993; Thomas und White, 1998). Als ein Homolog des zellulären Onkoproteins Bcl-2 verhindert das E1B-19 kDa Protein ebenfalls die Bildung des Bax-Protein-Komplexes und unterdrückt somit die TNF- α -induzierte Apoptose (Han *et al.*, 1996; Sundararajan und White, 2001). Die E1B-Region des Adenovirus-Serotyps 5, einem nicht-onkogenen Serotyp, kodiert für drei weitere E1B-Proteine: E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R. Für das E1B-156R-Protein ließ sich auch ein transformationsförderndes Potential zeigen (Sieber und Dobner, 2007).

Proteine der E4-Region

Obwohl der Adenovirus-Serotyp 9 in die Gruppe der nicht-onkogenen Adenoviren eingeordnet wurde, entstanden nach subkutaner oder intraperitonealer Injektion in weiblichen Mäusen östrogen-abhängige Tumore (Javier *et al.*, 1991; Javier und Shenk, 1996). Das onkogene Potential geht hierbei von dem E4-ORF1-Protein aus (Javier, 1994; Thomas *et al.*, 1999). Für die Proteine E4-ORF3 und E4-ORF6 des Adenovirus-Serotyps 5, welches ebenfalls in die Gruppe der nicht-onkogenen Adenoviren zugeordnet wurde, konnten in Kooperation mit den E1A- und E1B-Proteinen transformierende Eigenschaften gezeigt werden (siehe Übersicht Täubner und Dobner, 2001). So bindet das E4-ORF6-Protein, ähnlich wie das E1B-Protein, an das zelluläre Protein p53, wodurch dieses dem Proteasom-abhängigen Abbau zugeführt wird (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997, 1999).

1.3 Die Sprouty-Proteine

Die Sprouty-Proteine sind zelluläre zytoplasmatisch lokalisierte Proteine, die regulierend in den Rezeptor-Tyrosin-Kinase- (RTK) Signalweg eingreifen. Sie modulieren z.B. den aktivierten FGFR- (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor) oder EGFR- (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) Signalweg und beeinflussen somit entscheidend die Zellphysiologie (als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004). Sprouty (Spry) wurde erstmals in *Drosophila* gefunden. Das 63 kDa große Protein wird während der embryonalen Entwicklung unter anderem im sich ausbildenden Tracheensystem von *Drosophila melanogaster* exprimiert und konnte hier als FGF-Antagonist identifiziert werden. Als FGF-Antagonist reguliert es die Ausprägung der Tracheenverzweigung während der Entwicklung.

Über Sequenzierungsanalysen wurden zu *Drosophila* Sprouty-homologe Proteine im Genom des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*), des Zebrafärblings, des Haushuhns, der Maus und im menschlichen Genom identifiziert. In der Maus und im Menschen wurden vier Sprouty-Proteine gefunden. Diese sind im Vergleich zum *Drosophila* Homolog nur 32-34 kDa groß. Charakteristisch für alle Sprouty-Proteine ist die Sprouty-Domäne, ein cysteinreicher konservierter Bereich in der C-terminalen Hälfte des Proteins, der sowohl die Verankerung an der

Plasmamembran als auch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen vermittelt (vgl. Abb. 3; als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004).

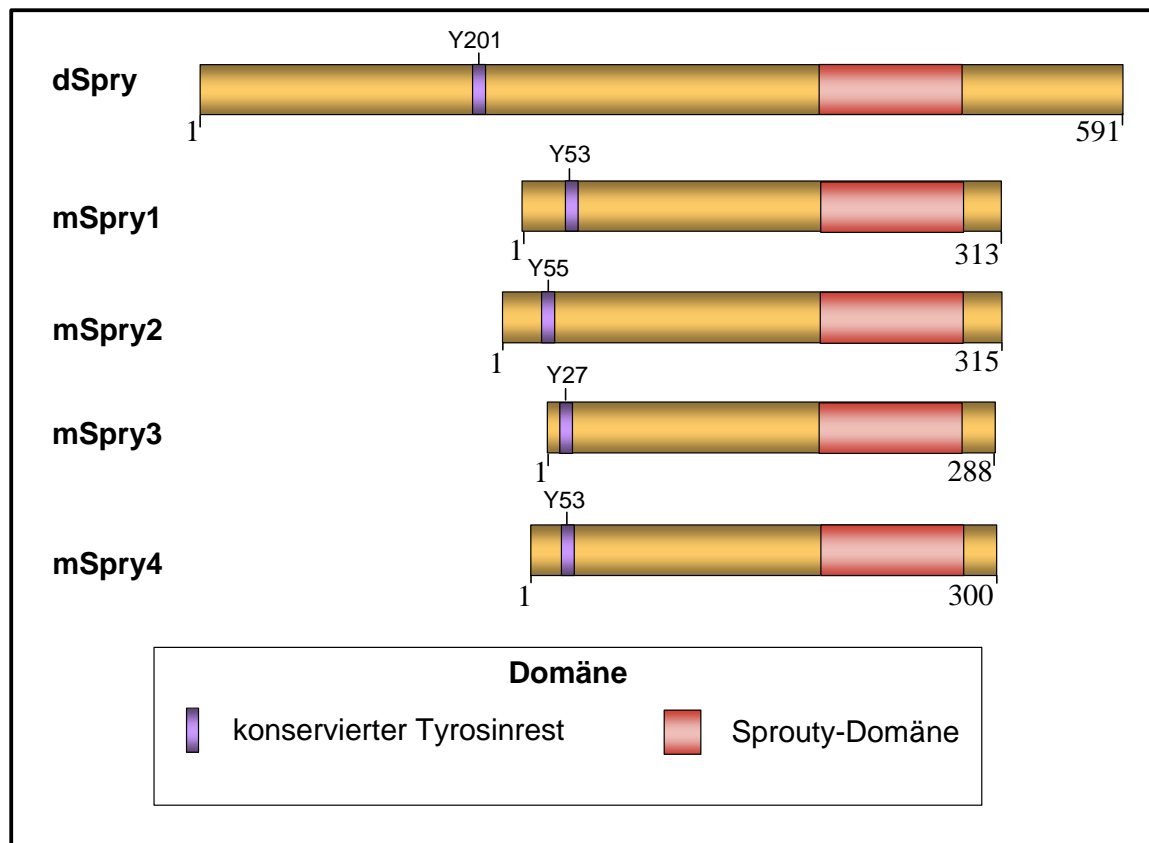


Abb. 3: Schematische Darstellung der Sprouty-Proteine. Die konservierten Bereiche der Sprouty-Proteine von *Drosophila* (dSpry) und Maus (mSpry) sind entsprechend farblich dargestellt. Die Zahlen unterhalb der Darstellungen geben die Aminosäureposition an. Y markiert den konservierten Tyrosinrest, welcher nach Aktivierung der RTK-Signalweges phosphoryliert wird.

In der N-terminalen Hälfte findet sich in einer kurzen konservierten Sequenzregion ein unveränderter Tyrosinrest, welcher nach Phosphorylierung für die inhibitorische Funktion von Sprouty z.B. innerhalb des FGFR-Signalweges essentiell ist und Homologien zu der katalytischen SRC-Autophosphorylierungs-Domäne aufweist (Mason *et al.*, 2004 und 2006; Hanafusa *et al.*, 2002). Das *spry2*-Gen weist den höchsten Grad an Homologie zu den Sprouty-Sequenzen anderer Spezies auf (als Übersicht siehe Mason *et al.*, 2006).

Obwohl die Sprouty-Domäne mittlerweile auch in weiteren Proteinfamilien nachgewiesen wurde, gilt die Spred (Sprouty-related EVH1 [Ena/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) homology 1] domain) Proteinfamilie als zweitprominentester Träger dieser konservierten Region (King *et al.*, 2005; Bundschu *et al.*,

2006; Wakioka *et al.*, 2001). Die Spred-Proteine weisen als zusätzliches Charakteristikum die Ena/VASP-Homologie-Domäne 1 (EVH1) und die KIT-Bindungsdomäne auf. Obwohl beide Proteinfamilien regulierend auf den RTK-Signalweg Einfluss nehmen, unterscheiden sie sich dadurch, dass sie über unterschiedliche biochemische Mechanismen eingreifen (als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004).

Der Einfluss der Sprouty-Proteine auf die Zellphysiologie ist sehr variabel und komplex. Die Funktion von Sprouty ist abhängig vom Zelltyp, dem jeweils aktivierten Rezeptor, den intrazellulär aktiven Proteinen sowie von dem jeweils involvierten Sprouty-Protein. Durch ihr Eingreifen wird der RTK-Signalweg nach Aktivierung durch extrazelluläre Liganden reguliert. RTK sind an der Zellmembran gebundene Rezeptoren, deren intrazelluläre Domäne nach Ligandenbindung phosphoryliert und dadurch ein Signaltransduktionsweg eingeleitet wird. Deren Folge ist die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, welche die Zellphysiologie entscheidend beeinflussen. Als vor allem negativ regulatorisch eingreifendes Protein interagiert Sprouty an verschiedenen Punkten innerhalb des Signalweges (z.B. über Grb2 oder Shp2) (als Übersicht siehe Mason *et al.*, 2006). Ein Teil der exprimierten Sprouty 1- und Sprouty 2-Proteine ist konstitutiv mit der Plasmamembran verankert und assoziiert hier mit Caveolin 1 (Impagnatiello *et al.*, 2001). Für die Palmitoylierung ist die Sprouty-Domäne, die daher auch als Translokationsdomäne bezeichnet wird, verantwortlich. Die Verankerung an der Plasmamembran ermöglicht nach Aktivierung des Rezeptors die gezielte Interaktion mit Adaptormolekülen (Lim *et al.*, 2002).

Die Aktivierung des Rezeptors nach Ligandenbindung wird durch die Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären katalytischen Domäne des Rezeptors eingeleitet. Über aktivierte Andockstellen binden Adaptormoleküle, wie z.B. Grb2 an den Rezeptor. Die Assoziation von Grb2 mit dem Rezeptor führt zur Rekrutierung des Ras-Aktivators SOS (son of sevenless) an die Zellmembran. SOS katalysiert die Umwandlung des inaktiven GDP-Ras in aktives GTP-Ras und initiiert dadurch eine Proteinkinase-Kaskade. Sprouty hat insbesondere Einfluss auf den ERK-Signalweg (extracellular-regulated kinases) (als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2001). Innerhalb des ERK/MAPK-Signalweges phosphoryliert und aktiviert Ras die MAPK-Kinase-Kinase Raf (MAPKKK), welche wiederum die MAPK-Kinasen MEK1 und MEK2 (MAPKK) phosphoryliert und somit aktiviert. Schließlich phosphorylieren und aktivieren die MAPKK die MAPK ERK1 (p44) und ERK2 (p42),

welche in den Zellkern translozieren, wo sie diverse Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (wie Elk-1 oder c-Myc), die z.B. an die Promotorsequenz des *serum response element* (SRE) binden und diesen transkriptionell beeinflussen. Die Regulation des RTK-Signalweges durch die Sprouty-Proteine kann schließlich durch die veränderte Transkription Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung, die Migration sowie die Apoptose nehmen (siehe als Übersicht Karin und Hunter, 1995; Cahill *et al.*, 1996). Eine Reihe von Interaktionspartnern der Sprouty-Familie wurde bisher identifiziert, doch deren Funktion nur teilweise entschlüsselt (siehe Tab. 1).

Ein inhibitorischer Einfluss der Sprouty-Proteine auf den RTK-Signalweg resultiert aus der Interaktion mit dem Adaptorprotein Grb2 und der Kinase Raf (Hanafusa *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2003). Dagegen wirkt sich nach Aktivierung des EGF-Rezeptors die Interaktion von Sprouty mit der E3-Ubiquitin-Ligase CBL positiv auf den Signaltransduktionsweg aus. Normalerweise bindet CBL an den aktivierten EGF-Rezeptor, wodurch dieser über die Anheftung von Ubiquitin-Molekülen für den Abbau im Proteasom markiert wird. In Anwesenheit von Sprouty 1 oder Sprouty 2 bindet CBL an Sprouty und markiert dieses für den Transport zum Proteasom. Als Konsequenz bleibt der EGF-Rezeptor länger im aktiven Zustand (Hall *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2004). Die Protein Tyrosinphosphatase Shp2 begünstigt wiederum die Aktivierung der ERK/MAPK über die Dephosphorylierung der Sprouty-Proteine (Hanafusa *et al.*, 2004). Die Interaktion von Sprouty 2 mit der Protein Tyrosinphosphatase-1B (PTP1B) hat dagegen Einfluss auf das Migrationsverhalten von HeLa-Zellen (Yigzaw *et al.*, 2003).

Da die aktiven Sprouty-Proteine kontrollierend auf die Expression weiterer Sprouty-Proteine einwirken, spricht man hier auch von einem „negative feedback loop“ (negative Rückkopplung) (Rubin *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2004).

Die Sprouty-Domäne vermittelt außerdem Homo- und Heterodimerisierungen zwischen den Sprouty-Proteinen (Hanafusa *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2004). Wu und Mitarbeiter fanden des Weiteren heraus, dass die Sprouty 2-Proteine über die Assoziation miteinander monodisperse Partikel ausbilden und als „intrazelluläre Batterien“ elektrische Ladung speichern können. Ob diese „Nanobatterien“ im Zusammenhang mit der inhibitorischen Funktion von Sprouty stehen, ist noch fraglich (Wu *et al.*, 2005).

Die Expression von Sprouty während der embryonalen Entwicklung in Säugetieren korreliert mit der Expression des FGF-Rezeptors.

Table 1. Sprouty-interacting proteins

Protein	Mode of interaction (+ Refs)	Domain/site of protein involved in interaction	Cell types	Consequences
Proteins associated with Spry1				
Caveolin-1	Constitutive, direct [12]	Unknown	HUVECs	Unknown but might play a role in constitutive plasma membrane association of Spry
Grb2	↑ with growth factor [9]	Spry1 Tyr53, Grb2 SH2	C2C12	Might antagonize RTK-induced ERK MAPK activation
c-CBL	↑ with growth factor [16]	Spry1 Tyr53, c-CBL TKB, by analogy with Spry2	NIH3T3	Unknown, but might play a role in the regulation of EGFR ubiquitylation and degradation, by analogy with Spry2
Shp2	Not shown [25]		C2C12	Might enhance ERK MAPK activation by dephosphorylation of Spry
Spry2	Constitutive [16]	Spry cysteine-rich domain	NIH3T3	Unknown
CIN85	Constitutive [33]	Spry proline-arginine motifs, CIN85 SH3	C2C12	Unknown but might play a role in the regulation of EGFR endocytosis and degradation, by analogy with Spry2
Proteins associated with Spry2				
Caveolin-1	Constitutive, direct [12]	Unknown	HUVECs	Unknown but might play a role in constitutive plasma membrane association of Spry
Grb2	Constitutive [3,11]	Unknown	NIH3T3, 293T	Might antagonize RTK-induced ERK MAPK activation
	Constitutive [10], ↑ with growth factor [9,10]	Spry2 Tyr55, Grb2 SH2	C2C12, MLE15	
c-CBL	Constitutive, direct [27]	Spry2 residues 11–53, c-CBL RING	293T	Regulation of EGFR ubiquitylation and degradation
	↑ with growth factor [16,19,21]	Spry2 Tyr55, c-CBL TKB	NIH3T3, CHO, COS7, 293T	
Cbl-b	Constitutive [27]	Unknown	293T	Unknown but might play a role in the regulation of EGFR ubiquitylation and degradation, by analogy with c-CBL
FRS2	Constitutive, ↑ with growth factor [10,16]	Unknown	NIH3T3, MLE15	Unknown
Shp2	Constitutive, ↓ with growth factor [10]	Unknown	MLE15	Might enhance ERK/MAPK activation by dephosphorylation of Spry
	Not shown [25]		C2C12	
Raf1	Constitutive, ↑ with growth factor [10], direct [6]	Spry RBD, C-terminal catalytic domain of Raf1	293T, MLE15	Inhibition of RTK-mediated, Ras-independent ERK MAPK activation
B-Raf	Direct [67]	Spry RBD, C-terminal catalytic domain of B-Raf by analogy with Raf1	Melanocytes, 293T	May inhibit RTK-mediated ERK/MAPK activation by analogy with Raf1
PTP1B	Not shown [35]		HeLa	Regulation of cell migration by upregulating PTP1B phosphatase activity
GAP1	Constitutive, ↓ with growth factor [10]	Unknown	MLE15	Unknown
Spry1	Constitutive [9,16,24]	Spry cysteine-rich domain	NIH3T3	Unknown
Spry2	Constitutive [9,24]	Spry cysteine-rich domain		Unknown
Spry4	Constitutive [9,16,24]	Spry cysteine-rich domain	NIH3T3	Unknown
CIN85	Constitutive [33]	Spry proline-arginine motifs, CIN85 SH3	C2C12	Regulation of EGFR endocytosis and degradation
Proteins associated with Spry4				
TESK1	Constitutive, ↑ with growth factor, direct [7]	Spry4 cysteine-rich domain, TSK1 N- and C-terminus	COS	Regulation of cell spreading by inhibiting TSK1 kinase activity
Raf1	Direct [6]	Spry RBD, C-terminal catalytic domain of Raf1	293T	Inhibition of RTK-mediated, Ras-independent ERK MAPK activation
B-Raf	Direct [67]	Spry RBD, C-terminal catalytic domain of B-Raf by analogy with Raf1	293T	Might inhibit RTK-mediated ERK MAPK activation by analogy with Raf1
Spry2	Constitutive [9,16,24]	Spry cysteine-rich domain	NIH3T3	Unknown
Spry4	Constitutive [9,24]	Spry cysteine-rich domain		Unknown

Abbreviations: HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; CHO, Chinese hamster ovary cells; SH2, Src-homology 2 domain; SH3, Src-homology 3 domain; TKB, tyrosine-kinase-binding domain; RBD, Raf1-binding domain.

Tab. 1: Sprouty-interagierende Proteine (aus Mason *et al.*, 2006).

Sprouty wird während der embryonalen Entwicklung in der Lunge, dem Nervensystem, im Herzen, Gastrointestinaltrakt und Muskelgewebe exprimiert (Minowada *et al.*, 1999; Chambers *et al.*, 2000). *Spry1*^{-/-} (*Spry1* Knockout-Mutation) Mäuse sind nur für eine kurze Zeit lebensfähig. Die Nierenentwicklung ist stark beeinträchtigt, da sich während der Nephrogenese überzählig Ureterknospen ausbilden und eine vielfache Anzahl von Uretern entwickeln (Basson *et al.*, 2005). *Spry2*^{-/-} Mäuse sind nur drei bis vier Wochen lebensfähig; sie sind etwas kleiner als der Wildtyp-Embryo und weisen einen abnormen Gastrointestinaltrakt und ein beeinträchtigtes Hörvermögen auf. Das Corti-Organ im Innenohr ist aufgrund einer abnormen Zytoarchitektur nicht richtig ausgebildet, was zur Beeinträchtigung des Hörvermögens führt (Shim *et al.*, 2005). Über *Spry3*^{-/-} und *Spry4*^{-/-} Mäuse wurden noch keine Publikationen veröffentlicht.

Aufgrund des komplexen und variablen Einflusses der Sprouty-Proteine auf die Zellphysiologie sowie auf die embryonale Entwicklung lässt sich hierbei auch von pleiotropen Effekten durch Sprouty-Proteine sprechen.

1.3.1 Die Funktion von Sprouty 1

Über spezifische Interaktionen mit bestimmten Faktoren des Signalweges (wie Grb2 und Shp2) nimmt Sprouty 1 auf den Signaltransduktionsweg regulierend Einfluss (als Übersicht siehe Mason *et al.*, 2006). Einige der bis jetzt bekannten Interaktionspartner von Sprouty 1 und der daraus resultierenden Funktion sind der Tab. 1 zu entnehmen. Die Expression von Sprouty-Proteinen wird unter anderem durch die Aktivierung der Ras-ERK-MAPK-Signalkaskade reguliert. Abe und Mitarbeiter konnten außerdem feststellen, dass die FGF-Rezeptor-induzierte Expression von Sprouty 1 in der Chondrozyten-Zelllinie ATDC5 zusätzlich von der Aktivierung der Phospholipase C γ und dem Kalzium Einstrom in die Zelle abhängig ist (Abe *et al.*, 2004). In T-Zellen hat die Expression von Sprouty 1 je nach Differenzierungsstadium unterschiedliche Funktionen: In naiven T-Zellen führt die Überexpression von Sprouty 1 nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors zu einer Verstärkung des „Signals“, was eine Erhöhung der Interleukin-2 Produktion zur Folge hat und die Proliferation anregt. In ausdifferenzierten Th1-Helferzellen inhibieren die Sprouty 1-Proteine den T-Zell-Rezeptor-Signalweg, wodurch die Interleukin-2 Produktion gehemmt wird (Choi *et al.*, 2006).

Wie Untersuchungen mit *Spry1*^{-/-} Mäuse zeigen, ist Sprouty 1 für die embryonale Entwicklung essentiell. Während der Entwicklung der Niere hat Sprouty 1 als Antagonist des GDNF/RET-Signalweges einen regulierenden Einfluss auf die Ausbildung der Ureterknospen. Es beeinflusst die Anzahl der sich ausbildenden Ureterknospen aus dem WOLFFschen Gang (Basson *et al.*, 2005).

1.3.2 Das Potential der Sprouty-Proteine als Tumorsuppressoren

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind fundamental in die Kontrolle der Zellphysiologie involviert. Sie beeinflussen somit die Proliferation, Migration und Differenzierung der Zelle sowie die Apoptoseeinleitung. Daher ist es wahrscheinlich, dass Sprouty als regulatorisch eingreifendes Protein des RTK-Signalweges auch Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt (als Übersicht siehe Lo *et al.*, 2005).

Bei bestimmten Krebserkrankungen hat man eine veränderte Expression von Sprouty-Proteinen nachweisen können. Eine verminderte Expression von Sprouty 1 ließ sich im Mamma- und Prostatakarzinom feststellen (Lo *et al.*, 2004; Kwabi-Addo *et al.*, 2004). Eine reduzierte Sprouty 2-Expression konnte häufig im Mammakarzinom und im Leberzellkarzinom nachgewiesen werden (Lo *et al.*, 2004; Fong *et al.*, 2006). Außerdem konnten Wang und Mitarbeiter eine verminderte Sprouty 4-Expression im Leberzellkarzinom nachweisen (Wang *et al.*, 2006). Die verminderte Expression von Sprouty 2 im Mammakarzinom, sowie die reduzierte Expression von Sprouty 4 im Prostatakarzinom lassen sich auf eine epigenetische Inaktivierung zurückführen. CpG-Inseln, die stromaufwärts der Transkriptionsinitiations-Sequenz der Sprouty-Gene liegen, sind in Tumorzellen hypermethyliert (McKie *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Weitere Hinweise für das Potential der Sprouty-Proteine als Tumorsuppressoren geben Untersuchungen, bei denen die Überexpression von Sprouty 1 und Sprouty 2 einen anti-proliferativen Effekt bewirkt (Kwabi-Addo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Außerdem konnten Shaw und Mitarbeiter zeigen, dass Sprouty 2 als Tumorsuppressor in der K-ras^{G12D} vermittelten Tumorentstehung der Lunge fungiert. (Shaw *et al.*, 2007). Da die Expression bestimmter Sprouty-Proteine im Mamma-, Prostata- und Leberzellkarzinom häufig reduziert wird, werden die Sprouty-Proteine als potentielle Tumormarker und daher auch als Tumorsuppressoren diskutiert.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Funktionen der E1A-Genprodukte des hoch-onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 innerhalb des Zellkerns sind weitgehend untersucht worden, jedoch ist nur wenig von der Funktion der im Zytoplasma lokalisierten E1A-Proteine bekannt. Die von Mason und Mitarbeitern entdeckte Acetylierung von E1A, die zum Verbleib der E1A-Proteine im Zytoplasma führt (Madison *et al.*, 2002), ließ vermuten, dass diese Proteine mit bestimmten zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen interagieren, um die Zellphysiologie zu beeinflussen.

Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung dieser zytoplasmatisch lokalisierten E1A-Interaktionspartner könnte möglicherweise neue Erkenntnisse zur E1A vermittelten Funktion bzw. Transformation geben. In unserer Arbeitsgruppe hat die Doktorandin Petra Filmether mit Hilfe eines „SOS-Two-Hybrid-Systems“ Sprouty 1 als einen zytoplasmatischen E1A-Interaktionspartner identifiziert.

Zur Analyse der Interaktion von E1A mit Sprouty sollten während meiner Doktorarbeit folgende Punkte erarbeitet werden:

- (1) Bestätigung der Interaktion zwischen den E1A-Proteinen und Sprouty 1 sowie zu weiteren Sprouty-Isoformen in Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vitro*
- (2) Identifizierung der für die Bindung verantwortlichen Domänen durch Deletionsmutationen und GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen
- (3) Aufzeigen von Hinweisen für eine physiologische Relevanz durch Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vivo* (Immunpräzipitation)
- (4) Bestätigung der Protein-Protein-Assoziation sowie der zytoplasmatischen Lokalisation durch Immunfluoreszenzstudien
- (5) Untersuchung einer funktionellen Interaktion von Sprouty 1 und E1A_{13S} unter Anwendung der Responseelemente TPA-*responsive element* (TRE) und *serum response element* (SRE) in transienten Expressionsanalysen, und über die Phosphorylierungsanalyse der ERK1/2-Kinasen.

2. Material

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“) und nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf wurden mit der entsprechenden Qualität im Fachhandel bezogen.

2.1 Chemikalien

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto Hefe Extrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Neu-Ulm
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Galaktose	Difco, Detroit, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

HEPES	
(Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactosid)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40 (Nonidet P-40)	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc	Biomol, Hamburg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED	
(N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X-100	BioRad, München
Trypton	Difco, Detroit, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen (2-50 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein; Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

T4-DNA-Ligase (1 U/μl)

Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion in Martinsried synthetisiert.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
5'-Ad2E1A	5'-ATAAGGATCCATGAGACATATTATCTGCCAC-3'
3'-Ad2E1A	5'-ATAAGGATCCTTATGGCCTGGGGCGTTTACA-3'
5'-Ad12-E1A13sBamHI	5'-ATAAGGATCCGTTGAGTGCCAGCGAGAAGAG-3'
3'-Ad12-E1A13sBamHI	5'-ATAAGGATCCAAATTACATCTAGGGCGTTTC-3'
5'-Ad12-E1A13sΔN	5'-ATAAGGATCCATGGTACCCAGTGATGATGAT-3'
3'-Ad12-E1A13sΔN	5'-ATAAGGATCCTTAATTACATCTAGGGCGTTT-3'
5'-cJun	5'-AAAAGGTACCATGACTGCAAAGATGGAAAC-3'
3'-cJun	5'-AAAATCTAGACTCAAAACGTTTGCAACTGC-3'
5'-cJunXbaI	5'-AAAATCTAGAATGACTGCAAAGATGGAAAC-3'
3'-cJunKpnI	5'-AAAAGGTACCCTCAAAACGTTTGCAACTGC-3'
5'-colTRE	5'-TTATGAAGCTTGATGGGTACCTATGATGAGTCAG AGAATCATGAGTCAGAGAATCATGAGTCAGATTCG GATCCTAGTT-3'
3'-colTRE	5'-AACTAGGATCCGAATCTGACTCATGATTCTCTGA CTCATGATTCTCTGACTCATCATAGGTACCCATCAA GCTTCATAA-3'
3'-hsv-tk	5'-ACGCGTCACCTTAATATGCG-3'
5'-pRc/RSV	5'-CGCATTGCAGAGATAATTGTATT-3'
3'-pRc/RSV708bp	5'-ACAGTCGAGGCTGATCAGCG-3'
5'-pSG9M	5'-CATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG-3'
3'-pSG9M	5'-TGAGCGAGGAAGCGGAAGAG-3'
5'-Spred1	5'-AAAAGGATCCATGAGCGAGGAGACGGCGACT-3'
3'-Spred1	5'-AAAAAAGCTTTCACCCAGCAGCCTTATGTTT-3'
5'-Spred2	5'-AAAACCCGGGATGACCGAAGAAACACACCCG-3'
3'-Spred2	5'-AAAAAAGCTTTCACGCGGCGGCTTTGTGCTT-3'

5'-Spry1EcoRV	5'-AAAAGATATCATGGATTCCCCAAGTCAGCAT-3'
3'-Spry1XhoI	5'-AAAAC TCGAGAGTCATGACAGCTTGCCCTGA-3'
5'-Spry1ΔC	5'-AAAAGGATCCATGGATTCCCCAAGTCAGCAT-3'
3'-Spry1ΔC	5'-AAAAGCTTTCACCTTGTGCTGGGTGGGGTCCT-3'
5'-Spry1ΔN	5'-AAAAGGATCCATGTTCATATGCGAACAGTGT-3'
3'-Spry1ΔN	5'-AAAAAAGCTTAGTCATGACAGCTTGCCCTGA-3'

2.4 Plasmide

pcDNA3.1(-)/Myc/His	eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem Myc-Epitop und einem C-terminalen Polyhistidin exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA3-MS4	exprimiert Sprouty 4 (<i>mus musculus</i>) als Fusionsprotein mit einem 6 x Myc-Epitop, zur Verfügung gestellt von A. Yoshimura, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan
pcDNA-Spred1	exprimiert Spred 1 (<i>mus musculus</i>) als Fusionsprotein mit einem 6 x Myc-Epitop, zur Verfügung gestellt von A. Yoshimura, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan
pcDNA-Spred2	exprimiert Spred 2 (<i>mus musculus</i>) als Fusionsprotein mit einem 6x Myc-Epitop, zur Verfügung gestellt von A. Yoshimura, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

pCR3.1	eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe)
pGEM-T	bakterieller Expressionsvektor, der aufgrund von 3'-T- Überhängen die direkte Einklonierung von PCR-Produkten ermöglicht (Promega, Mannheim)
pGEX-2T	bakterieller Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminalen GST-Proteindomäne exprimiert, (Pharmacia Biotech, Freiburg)
pGex-2T-HPV-E7	bakterieller Expressionsvektor, der die cDNA des E7-Onkoproteins des humanen Papillomavirustyp 16 mit der GST-Proteindomäne exprimiert, zur Verfügung gestellt über K. Lowinski (Universitätsklinikum Essen) von D.J. McCance, University of Rochester, Medical School, New York, USA
pGL3	Luciferase Reporter Vektor (Promega, Mannheim)
pRc/RSV	eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe)
pSG9M	eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem Myc-Epitop exprimiert, zur Verfügung gestellt von G. Christofori, Institut für Biochemie und Genetik, Basel, Schweiz

pSG9M-MS1	exprimiert Sprouty 1 (<i>mus musculus</i>) als Fusionsprotein mit einem Myc-Epitop, zur Verfügung gestellt von G. Christofori, Institut für Biochemie und Genetik, Basel, Schweiz
pSG9M-MS2	exprimiert Sprouty 2 (<i>mus musculus</i>) als Fusionsprotein mit einem Myc-Epitop, zur Verfügung gestellt von G. Christofori, Institut für Biochemie und Genetik, Basel, Schweiz
pSRE-Luc	Luciferase Reporter Vektor, der 5 x die Sequenz des <i>serum response element</i> enthält (Stratagene, Heidelberg)

2.5 Antikörper

Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen-AK (H+L) IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 anti-Maus-AK (H+L) IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ad12E1A-Antiserum polyklonales Kaninchen-Antiserum	Herstellung über Genovac, Freiburg
Anti-c-Jun-AK (H-79) sc-1694 polyklonales Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus-AK Peroxidase-konjugiert	Perbio Science, Bonn
Anti-Myc-Epitop-AK monoklonales Maus IgG	Invitrogen, Karlsruhe

Anti-Phospho-ERK1/2(p44/42) Map-Kinase-AK (Thr202/Tyr204) (#9101) Polyklonales Kaninchen IgG	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-ERK1/2(p44/42) Map-Kinase-AK (#9102) polyklonales Kaninchen IgG	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-Kaninchen-AK Peroxidase-konjugiert	Perbio Science, Bonn
Anti-Sprouty 1-AK (H-120) sc-30048 polyklonales Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.6 Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen, -schalen	Becton Dickinson, New York, USA über Oehmen, Essen
Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Coelbe
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Neugeborenes Kälberserum (NKS)	PAA, Coelbe

Penicillin G (1000 U/ml)	Gibco, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Transfectin, Lipid Reagenz	BioRad, München

2.7 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

2 x YT-Medium	16 g Trypton 10 g Bacto-Hefe-Extrakt 5 g NaCl ad. 1 l A. bidest
Ampicillinlösung	50 mg/ml in A. bidest
APS-Lösung	10 % (w/v) APS in A. bidest
DNA-Probenpuffer (6x)	150 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolbau 0,25 % (w/v) Xylenxanol FF 30 % (v/v) Glycerin
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in A. bidest

Gelfärbelösung (SDS-PAGE)	450 ml A. bidest 450 ml Methanol 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
Gelfixierlösung (SDS-PAGE)	50 % (v/v) 2-Propanol 7 % (v/v) Essigsäure
IPTG-Lösung	1 M in H ₂ O (bei -20 °C gelagert)
LB-Medium	2,5 % (w/v) LB (Luria-Bertoni)
Mowiol	0,25 % (w/v) Mowiol 2,5 % (w/v) Dabco
NETN-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,4 % NP40
NP-40 Lysepuffer	50 mM NaCl 1 % NP-40 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 1:100 Pefablock kurz vor Gebrauch zugeben
Paraformaldehyd-Lösung	3 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
PBS	4 mM MgSO ₄ 7 mM CaCl ₂ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄

PBS ⁻	wie PBS, ohne MgSO ₄ und CaCl ₂
PBS-Tween	0,1 % (v/v) Tween in PBS ⁻
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO ₃ In H ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 7,2 einstellen, mit H ₂ O ad 250 ml auffüllen und in 5 ml Aliquots abfüllen
Permeabilisierungslösung	PBS 0,1 % (v/v) Triton-X-100
Ripa-Puffer	1 % NP-40 1 % Deoxycholsäure 0,1 % SDS 0,15 M NaCl 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,2 2 mM EDTA 50 mM Natriumfluorid 200 µM Natriumorthovanadat 0,1 µM Aprotinin 2 mM PMSF
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS

SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl, pH 6,8 0,6 M DTT 12 % SDS 60 % Glycerin 0,6 % Bromphenolblau
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween	0,1 % (v/v) Tween in TBS
Transferpuffer (für Western Blots)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/l Trypsin in PBS ⁻

2.8 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide (Gibco, Eggenstein).

E. coli K12 BL21 (F⁻, *ompT*, *hsdS* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*) ist ein Protease-defizienter Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.9 Zelllinien

C33A-Zellen	Humane epitheloide Zervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
HeLa-tk ⁻ -Zellen	Humane epitheloide Zervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
NIH-3T3-Zellen	Etablierte Maus-Fibroblastenzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA

2.10 Molekulargewichtstandards

1 kb plus Marker	Invitrogen, Karlsruhe
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München

2.11 Reaktions- und Nachweis- „Kits“ und spezielle Reagenzien

BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz-Detektionssystem (für Western Blot)	Perbio Science, Bonn
Mowiol	Höchst, Frankfurt am Main
ECL-Western Blotting Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

PCR Mycoplasma Test Kit	Applichem, Darmstadt
Pefablock SC	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
pGEM [®] -T Vector System (TA-Cloning)	Promega, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Qiagen-Plasmid-Maxipräparations-Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden

2.12 Filme, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Adhäsions-Objektträger	Histobond, Marienfeld
Bradford-Reagenz	BioRad, München
control IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Elektroporationsküvetten 0,4 mm	Peqlab, Erlangen
Glutathione Sepharose-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A/G Plus Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Protein-A Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

2.13 Spezielle Laborgeräte

DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Electro Square Porator ECM 830	BTX Instruments, Massachusetts, USA
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SL	Leica, Düsseldorf
Luminometer Lumat LB 9501	Berthold, Wildbad
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA

3. Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Hier nicht gesondert aufgeführte molekularbiologische Arbeitstechniken wurden gemäß den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.* 1997) durchgeführt.

Das Arbeiten mit Säugerzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Materialien wurden bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert.

3.2 Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter oder restringierter DNA, sowie die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction-Kits“ (Firma Qiagen). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des „QIAamp DNA Mini Kits“ bzw. „Qiagen-Plasmid-DNA-Maxipräparationskits“ (Firma Qiagen). DNA-Sequenzierungen wurden von der Sequenzierfirma GATC in Konstanz durchgeführt.

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis *et al.* 1986)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur selektiven Anreicherung von definierten DNA-Bereichen *in vitro*. Hierfür macht man sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, einzelsträngige Matrizen-DNA zu einem Doppelstrang zu polymerisieren, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Startermolekül („Primer“) zur Verfügung steht. Als Primer dienen zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide, die in den Randbereichen komplementär zu der zu amplifizierten Sequenz sind und unter geeigneten Bedingungen sequenzspezifisch an den

Matrizenstrang binden. Die Synthese von Oligonukleotiden wurde als Auftragsarbeit von der Firma Metabion (Martinsried) durchgeführt.

3.3 Zellkultur

Die adhärenenten Zelllinien C33A, HeLa-tk⁻ und NIH-3T3 wurden bei 37 °C im Brutschrank in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium wurde DMEM verwendet, dem auf 500 ml ergänzend 10 % Fötale Kälberserum (FKS), 1,5 % 100 x nicht-essentielle Aminosäuren, 1,5 % einer 2 mM L-Glutamin-Lösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurden (als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Die verwendeten Lösungen wurden für alle routinemäßigen Zellkulturarbeiten auf 37 °C vorgewärmt. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der Zellkulturoberfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 auf neue Zellkulturgefäße überführt. Zur Lagerung von Zellen wurden diese bei 50 % Konfluenz wie oben beschrieben behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (1 min, 600 x g, RT), in 2-3 ml Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden dann mit Zellstoff umwickelt, 24 h bei -80 °C aufbewahrt und danach in Flüssigstickstoff gelagert. Die Zellen wurden außerdem regelmäßig über eine PCR auf Mykoplasmen überprüft.

3.4 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mittels Elektroporation (s. Kap. 3.4.1) oder durch liposomale Transfektionsreagenz (s. Kap. 3.4.2).

3.4.1 Elektroporation

Für die Elektroporation wurde mit dem „Electro Square Porator ECM 830“ der Firma BTX Instruments gearbeitet. Hierzu wurden 5×10^6 HeLa-Zellen mit 10 µg der zu transfizierenden DNA in 700 µl DMEM-Vollmedium mit 20 % FKS in die Elektroporationsküvette überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 V für 99 ms und 2 Pulsen bei RT elektroporiert. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit bei RT wurden die transfizierten Zellen in DMEM-Vollmedium auf 100 x 20 mm Ø Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen komplett umgesetzt und am Tag darauf geerntet (s. Kap. 3.5.1).

3.4.2 Lipofektion

Die Transfektion von Eukaryontenzellen erfolgte unter Verwendung der liposomalen Transfektionsreagenz TransFectin der Firma BioRad. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden für den Luciferase Reporter Assay (s. Kap. 3.5.6) und die Immunfluoreszenz-Untersuchungen (s. Kap. 3.5.8) 1 Tag vor Transfektionsbeginn $2,5 \times 10^5$ HeLa- bzw. C33A-Zellen und von den NIH-3T3-Zellen $1,8 \times 10^5$ Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten in DMEM-Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden für 5 h mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und FKS mit 2 µg Gesamt-DNA und den Lipidkomplexen, inkubiert. Die Transfektion wurde durch die Zugabe von 5 ml DMEM-Vollmedium gestoppt.

Für die Immunpräzipitation (s. Kap. 3.5.7) und die ERK1/2-MAP-Kinasen Analyse wurden 1 Tag vor Transfektionsbeginn 2×10^6 HeLa-Zellen in 100 x 20 mm Ø Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Gesamt-DNA für die Immunpräzipitation und mit 16 µg Gesamt-DNA für die ERK1/2-MAP-Kinasen Analyse transfiziert und die Reaktion mit 10 ml DMEM-Vollmedium gestoppt.

3.5 Analyse von Proteinen

3.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden konfluent gewachsene Zellen in 4 °C kaltem PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Abschaben in PBS⁻ geerntet und bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in NP40-Lysepuffer resuspendiert und dreimal im Wechsel für jeweils 1 min in Stickstoff und anschließend für 1 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Hiernach wurden die Extrakte für 15 min bei 4 °C geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden bei 51000 x g und 4 °C für 30 min pelletiert und der klare Überstand abgenommen.

Für den ERK1/2-MAPK Assay wurden die Zellen vor dem Abschaben mit 100 µl Ripa Puffer bei 4 °C für 15 min geschwenkt. Das Lysat wurde anschließend mit einer Spritze über ein 22 g Kanüle fünfmal angezogen und anschließend für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976).

3.5.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellem Extrakt erfolgte durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose 4B. Hierfür wurde ein prokaryontischer Expressionsvektor des pGEX-Systems, welcher nach Induktion mit IPTG die entsprechenden cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminal gekoppelten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* exprimieren, in Bakterien des *E. coli* Stammes BL21 transformiert.

Ein Einzelklon wurde in eine Übernachtskultur in 2 x YT-Medium inokuliert und diese am nächsten Tag bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 herunter verdünnt (ca. 1 l). Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8-1 wurde die Expression der GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 100 µl 1 M IPTG für 1-2 h induziert. Im Anschluss wurde die Kultur gedrittelt und jeweils 1 Aliquot, wie im Folgenden beschrieben, aufgereinigt. Das Pellet

wurde in 10 ml NETN-Puffer resuspendiert, 50 µl einer Lysozymlösung (100 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um die Bakterien vollständig zu lysieren wurden die Proben mit dem Ultraschalldesintegrator (sechsmal für je 10 s; Stufe 5) beschallt. Nach einer Zentrifugation (18300 x g, 20 min) wurden 200 µl mit NETN-Puffer gewaschene Glutathion-Sepharose hinzugegeben. Diese wurde zuvor durch eine 15 min Inkubation mit Milchpulver in NETN-Puffer abgesättigt. Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C auf einem Schüttelrad inkubiert und mit NETN-Puffer gewaschen. Die an Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsproteine wurden anschließend in 200 µl NETN-Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976). Die portionierten GST-Fusionsproteine wurden bei -80 °C gelagert. Zur qualitativen Bestimmung der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden 20 µg in 10 µl 6 x SDS-Probenpuffer für 5 min gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

3.5.3 GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen

Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurden zur Absättigung 0,5 mg des zellulären Lysats, welches das jeweils überexprimierte Protein aus einer Elektroporation enthielt, mit 50 µl Glutathion-Sepharose für 1 h bei 4 °C im Schüttelrad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 110 x g für 3 min und 4 °C wurden die abgesättigten Zellextrakte zu 50 µg GST-gekoppelten Fusionsproteine überführt. Die Bindungsreaktion erfolgte für 1 h bei 4 °C im Schüttelrad. Hiernach wurden die über Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsprotein-Protein-Komplexe abzentrifugiert (110 x g, 1 min, 4 °C) und fünfmal mit je 1 ml NP-40 Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe von 40 µl 6 x SDS-Puffer wurden die Protein-Komplexe für 5 min gekocht. Zur quantitativen Überprüfung wurden 10 µl der Proben auf ein 12 % SDS-Kontrollgel aufgetragen und danach mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die verbliebenen 30 µl wurden auf ein weiteres 12 % SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die interagierenden Proteine wurden anschließend mittels Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern detektiert (s. Kap. 3.5.5).

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen wurde unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Trenngele (im Bereich von 12 - 15 %, C-Wert: 2,7 %) und Sammelgele (5 %, C-Wert: 2,7 %) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer vermischt und für 5 min gekocht. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer.

3.5.5 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kap. 3.5.4) und auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C-extra) überführt. Vor Gebrauch wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte anschließend für 90 - 120 min (RT) bei einer Stromstärke von $1,6 \text{ mA/cm}^2$ mit der „Semi-Dry-Blot“ Apparatur (BioRad).

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 min in PBS bzw. TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit PBS- bzw. TBS-T/10 % Milchpulver bei RT blockiert und danach in dem entsprechend gleichen Puffer mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:200 bis 1:5000, je nach Antikörper) über Nacht inkubiert. Hiernach wurde die Membran dreimal für 10 min in PBS/T bzw. TBS/T gewaschen und danach mit einem sekundären, Merrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den F_c -Anteil des Primärantikörpers gerichtet ist, für 1 h in PBS-T/1% Milchpulver bzw. TBS-T/1% Milchpulver (Verdünnung 1:50000) bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe durch das Detektionssystem gemäß den Angaben des Herstellers. Für weitere Antikörperreaktionen mit der Membran wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in PBS- bzw. TBS-0,2 % Tween für 10 - 40 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz im entsprechenden Puffer gewaschen und einer erneuten Antikörperreaktion unterzogen.

3.5.6 Luciferase Reporter Assay

Der Luciferase Reporter Assay wird zur quantitativen Messung der Expression von Luciferase in eukaryontischen Zellen, die mit einem für die *Photinus pyralis*-Luciferase codierenden Vektor transfiziert wurden, eingesetzt. 14 h nach einer Transfektion von HeLa-Zellen mit liposomaler Transfektionsreagenz in 6-Loch-Zellkulturplatten (s. Kap. 3.4.2) erhielten die Zellen frisches DMEM-Vollmedium und wurden nach weiteren 49 h geerntet.

Bei den SRE-Reporterplasmid-Assays in denen eine Stimulierung mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) oder dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) erfolgte, erhielten die HeLa-, C33A- bzw. NIH-3T3 Zellen 14 h nach einer Transfektion DMEM-Medium mit 1,5 % 100 x nicht-essentielle Aminosäuren, 1,5 % einer 2 mM L-Glutamin-Lösung, 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin und 0,5 % Neugeborenen Kälberserum (NKS) (0,5 %iges NKS-DMEM-Medium oder Serum-reduziertes-Vollmedium). Nach weiteren 24 h erhielten die „hungernden Zellen“ DMEM-Vollmedium oder DMEM 0,5 %iges NKS-DMEM-Medium mit 20ng/ ml bFGF. Im Weiteren folgte eine Inkubationsdauer von 1 – 9 h und im Anschluss wurden die Zellen 2 x mit PBS⁻ gewaschen und nach einer 10 min Inkubation mit 70 µl Reporter-Lysis-Puffer (Promega, # E1531) geerntet. Die Proben wurden gevortext und bei 20000 x g für 4 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und als Zellextrakt bei -70 °C aufbewahrt. Die Messung der Luciferase Aktivität wurde mit 5 µl der Proben in dem Luminometer Lumat LB 9501 durchgeführt. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen (Methode nach Bradford, 1976) wurden zu den Messwerten mit einbezogen.

3.5.7 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitationen wurden HeLa-Zellen durch Lipofektion transient transfiziert (s. Kap. 3.4.2). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS⁻ gewaschen und mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale gelöst und abzentrifugiert (1500 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde mit Ripa-Puffer (4 °C) resuspendiert und dreimal im Wechsel für jeweils 1 min in Stickstoff und anschließend für 1 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte für 15

min bei 4 °C geschüttelt und im Nachfolgenden bei 51000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mit der Bradford-Reagenz bestimmt.

0,5 mg der Gesamtzellextrakte wurden mit Ripa-Puffer auf ein Volumen von 1 ml eingestellt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 0,25 µg control IgG (Santa Cruz) und 20 µl Protein-A/G Plus Agarose bei einer Inkubation für 30 min und 4 °C im Schüttelrad abgesättigt. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C für 0,5 min abgenommen und mit dem entsprechenden Antikörper (1,5 µg) auf einem Schüttelrad bei 4 °C für 90 min inkubiert. Hiernach wurden 20 µl Protein-A/G Plus Agarose hinzupipettiert und der gesamte Ansatz für weitere 16 h im Schüttelrad bei 4 °C inkubiert. Die über die Protein-A/G Plus Agarose immobilisierten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden abzentrifugiert (1000 x g, 0,5 min, 4 °C) und dreimal mit je 1 ml Ripa-Puffer gewaschen. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden anschließend in 40 µl 2 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden im Anschluss wie in Kap. 3.5.5 beschrieben auf Nitrocellulose-membran transferiert und über entsprechende Antikörper nachgewiesen.

3.5.8 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden HeLa-Zellen wie in Kap 3.4.2 beschrieben transient transfiziert. Die Zellen wurden 14 h nach der Transfektion in einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ Zellen auf sterilen Glasdeckgläschen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h in 0,5 %iges NKS-DMEM-Vollmedium inkubiert, (statt 10 % FKS wurden dem DMEM-Medium 0,5 % NKS beigesetzt, vgl. Kap 3.5.6). Im Anschluss wurden die „hungernden Zellen“ zur Stimulierung für 2 h in 0,5 %igem NKS-DMEM-Vollmedium mit 20ng/ ml bFGF inkubiert. Hiernach wurden die Deckgläschen mit den angewachsenen Zellen durch kurzes Eintauchen in PBS (RT) gewaschen und mit 3 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Fixativ entfernt und das Präparat dreimal für je 5 min mit PBS/ 100 mM Glycin gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 4 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS

wurden die Zellen für 30 min in PBS/ 1 % BSA inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS/ 1 % BSA (Verdünnung je nach Antikörper 1: 100 bis 1: 200) für 1 h. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h in PBS/ 1 % BSA (Verdünnung 1: 100). Nach einem weiteren Waschgang wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckt und bis zur Betrachtung mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop der Firma Leica bei 4 °C aufbewahrt.

4. Ergebnisse

Über die Funktion der im Zytoplasma verbleibenden E1A-Proteine ist nur wenig bekannt. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe eines „SOS-Two-Hybrid-Systems“ gezielt nach zytoplasmatisch lokalisierten zellulären E1A-Interaktionspartnern gesucht. Hierbei fand sich erstmals der Hinweis, dass Maus Sprouty 1-Proteine mit den E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 interagieren. Die Interaktion mit Sprouty 1 könnte einen weiteren Mechanismus darstellen, über den die E1A-Proteine zelluläre Prozesse, wie die Zellzykluskontrolle, die Differenzierung oder Apoptose entscheidend beeinflussen und der im Weiteren zur virusinduzierten zellulären Transformation nicht-permissiver Zellen beitragen könnte.

Nachdem diese Interaktion durch weitere Analysen bestätigt werden sollte, war es insbesondere von Interesse, die Funktion dieser Interaktion aufzuklären. Über die funktionelle Konsequenz der Interaktion zwischen den E1A-Proteinen und Sprouty war zu Beginn meiner Doktorarbeit nichts bekannt. Als „Schlüsselprotein“ des RTK-Signalweges nimmt Sprouty Einfluss auf die Regulation der Genexpression, wodurch die Differenzierung, Proliferation, Migration und die Einleitung der Apoptose beeinflusst werden kann (siehe als Übersicht Kim *et al.*, 2004). Aus diesem Grund sollte analysiert werden, ob und welche Auswirkungen die Interaktion von E1A mit Sprouty auf den RTK-Signalweg hat.

4.1 Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine mit den zellulären Sprouty-Proteinen

Zu Beginn meiner Untersuchungen war bekannt, dass das E1A_{9,5S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 12 über seinen N-Terminus mit Sprouty 1 interagiert. Im ersten Teil meiner Doktorarbeit wurden die Interaktionen der E1A-Proteine mit den Sprouty-Proteinen über Protein-Protein-Interaktionsanalysen *in vitro* und *in vivo* bestätigt und charakterisiert.

4.1.1 Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine des Serotyps 12 mit Sprouty-Proteinen und Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen *in vitro*

Zu Anfang wurden die Ergebnisse aus dem „SOS-Two-Hybrid-System“ über *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsanalysen bestätigt und charakterisiert. Die für die „GST-Pull-Down-Analysen“ notwendige cDNA der E1A-Wildtyp-Proteine und des Δ NE1A_{12S}-Mutantenproteins lagen in unserer Arbeitsgruppe in dem bakteriellen Expressionsvektor pGex-2T bereits vor. Die Deletionsmutante Δ NE1A_{13S} wurde unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert und anschließend in den Vektor pGex-2T einkloniert. Die cDNAs der verwendeten Maus Sprouty-Proteine 1 (mSpry1) und 2 (mSpry2) wurden von der Arbeitsgruppe von Herr Prof. G. Christofori (in Basel, Schweiz) in dem Plasmid pSG9M zur Verfügung gestellt, welches zur Analyse das Sprouty-Protein mit einem Myc-Epitop exprimiert. Herr Prof. A. Yoshimura (in Fukuoka, Japan) stellte uns die cDNA von Maus Sprouty 4 (mSpry4) in dem Plasmid pcDNA3 zur Verfügung, das als Fusionsprotein mit einem 6 x Myc-Epitop exprimiert wird. Die Deletionsmutanten Δ N Maus Sprouty 1 (Δ NmSpry1) und Δ C Maus Sprouty 1 (Δ CmSpry1) wurden unter Anwendung von jeweils spezifischen Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in das Plasmid pSG9M kloniert. Zur Übersicht der verwendeten Konstrukte für die Protein-Protein-Interaktionsanalyse siehe Abb.4.

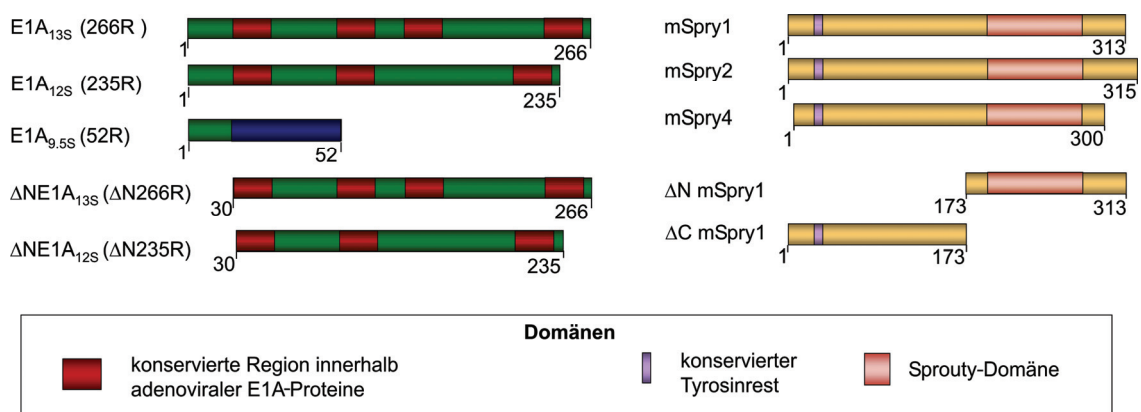


Abb. 4: Schematische Darstellung der für die Protein-Protein-Interaktionsanalysen verwendeten E1A- und Sprouty-Proteine. A) Die roten Rechtecke stellen die konservierten Regionen 1-4 (CR1, CR2, CR3, CR4) dar. Bei dem E1A_{9,5S}-Protein erfolgt durch das Spleißen nach der 29. Aminosäure eine Leserasterverschiebung. **B)** Die Sprouty-Proteine (mSpry) enthalten eine kurze N-terminal konservierte Region, sowie die konservierte Sprouty-Domäne in der C-terminalen Hälfte. Die Zahlen unterhalb der Darstellung geben die Position der Aminosäuren an.

Für die *in vitro* Interaktionsanalysen wurden GST-E1A-Wildtyp-Fusionsproteine oder die entsprechenden GST-E1A-Fusionsproteinmutanten an Gluthationsepharose immobilisiert und mit zellulärem Lysat, welches das jeweils überexprimierte Sprouty-Protein als Wildtyp oder Mutante enthielt, inkubiert. Interagierende Proteine wurden mittels Immunoblot-Analysen unter Anwendung von anti-Myc-Antikörper detektiert. Um das Ausmaß der Affinität vergleichend studieren zu können, wurden quantitative Überprüfungen der eingesetzten GST-Fusionsproteine durchgeführt (siehe Abb. 5C). Die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsstudien sind in Abb. 5 dargestellt. Wie für alle hier dargestellten Ergebnisse wurden die Interaktionsanalysen mindestens dreimal wiederholt, um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten.

Für Sprouty 1 konnte ich eine Interaktion mit den drei eingesetzten Wildtyp-Proteinen E1A_{13S}, E1A_{12S} und E1A_{9,5S} des Adenovirus-Serotyps 12 nachweisen und somit die Ergebnisse aus dem „SOS-Two-Hybrid-System“ bestätigen (Abb. 5A). Eine Analyse der verantwortlichen Proteininteraktionsdomänen von E1A wurde aus folgenden Gründen mit den aminoterminalen Deletionsmutanten Δ NE1A_{13S} und Δ NE1A_{12S} durchgeführt:

- (1) Im „SOS-Two-Hybrid-System“ konnte der N-Terminus von E1A_{9,5S} als essentielle Sprouty 1 Interaktionsdomäne identifiziert werden.
- (2) Alle E1A-Proteine des Adenovirus-Serotyps 12 weisen die identische aminoterminal Sequenz auf.
- (3) Die adenoviralen E1A_{13S}- und E1A_{12S}- Proteine des Serotyps 12 unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur durch die konservierte Region 3 (CR3).

In den Interaktionsstudien mit den E1A-Deletionsmutanten konnte ich eine schwachaffine Interaktion mit der Mutante Δ NE1A_{13S} detektieren. Für die Interaktion von Sprouty 1 mit Δ NE1A_{12S} ließ sich jedoch keine Bindung nachweisen (vgl. Abb. 5 A). Diese Ergebnisse bestätigen somit die Annahme, dass der Aminoterminus von E1A für die Interaktion mit Sprouty 1 verantwortlich ist. Die Mutante Δ NE1A_{13S} enthält im Gegensatz zur Δ NE1A_{12S}-Mutante die konservierte Region 3 (CR3). Da ich keine Interaktion zwischen Δ NE1A_{12S} und Sprouty 1 nachweisen konnte, lässt sich schlussfolgern, dass diese Domäne in die Interaktion mit Sprouty 1 zumindest involviert ist.

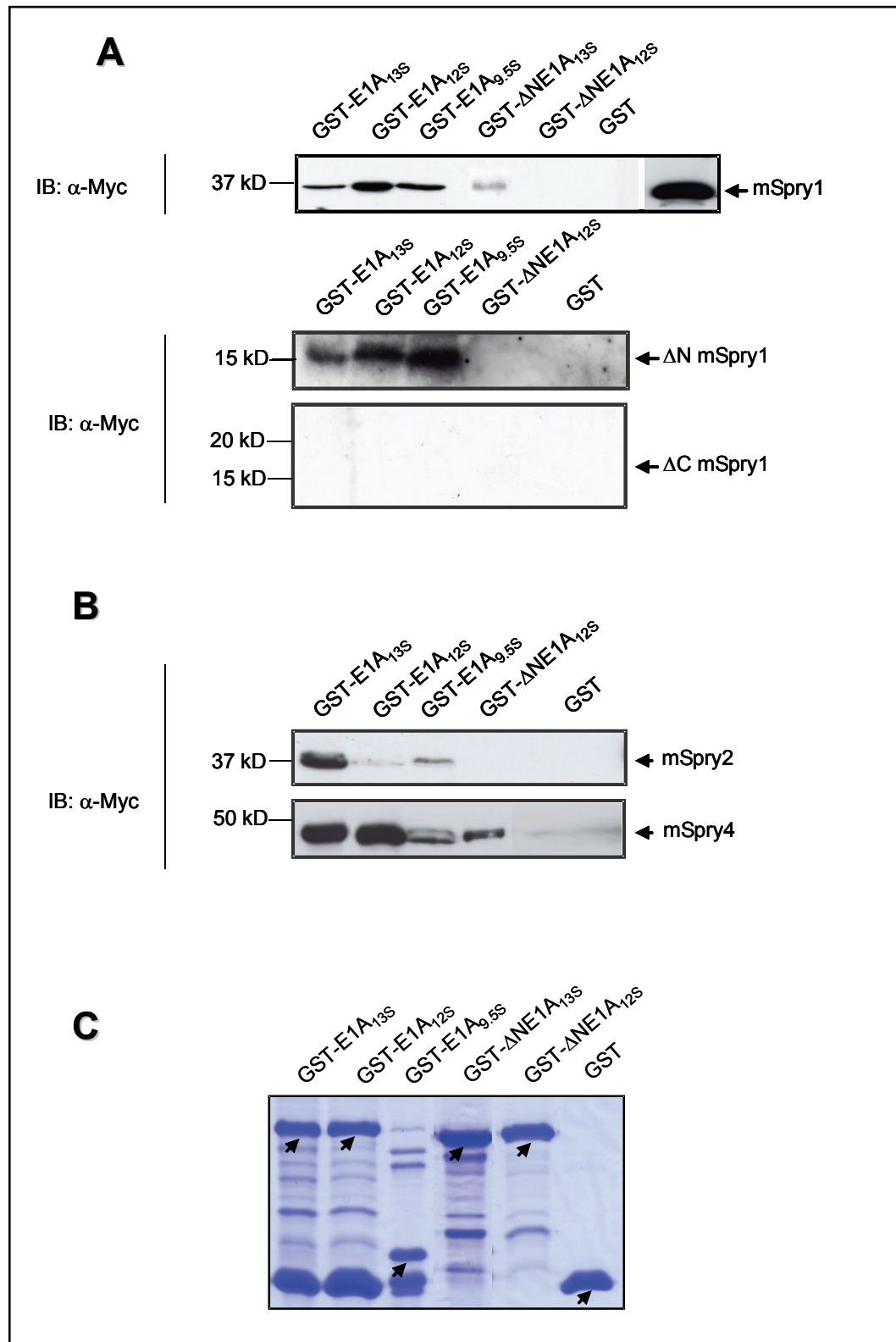


Abb. 5: Adenovirus-Serotyp 12 E1A-Proteine interagieren mit Sprouty-Proteinen *in vitro*. In den GST-Fusionsprotein-Interaktionsstudien wurden die verschiedenen GST-E1A-Fusionsproteine des Adenovirus-Serotyp 12 (Ad12) mit dem entsprechenden Zellextrakt wie angegeben inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und über das Myc-Tag mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle wurde für jedes Experiment das GST-Protein mit dem jeweiligen Zellextrakt inkubiert. **(A)** Interaktionsanalyse mit den angegebenen GST-E1A-Fusionsproteinen und dem entsprechenden Zellextrakt, welches überexprimiertes Sprouty 1 (mSpry1) bzw. Δ NmSpry1 oder Δ CmSpry 1 enthält. **(B)**

Zur weiteren Analyse wurden Inkubationen mit Sprouty 2 (mSpry2) bzw. Sprouty 4 (mSpry4) enthaltenem Zellextrakt durchgeführt. (C) Zur quantitativen Kontrolle der eingesetzten GST-Fusionsprotein-Mengen wurden gleiche Aliquots der GST-Fusionsproteine auf 12%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

Zur Identifikation der für die E1A-Interaktion verantwortlichen Domäne von Sprouty 1 wurden „GST-Pull-down-Analysen“ mit den Sprouty-Mutanten Δ NmSpry1 (eine Mutante, in der die aminoterminalen Hälfte von Sprouty 1 - von aa 1 bis 173 - deletiert wurde) und Δ CmSpry1 (eine Mutante, in der die carboxyterminale Hälfte von Sprouty 1 – von aa 173 bis 313 - deletiert wurde) durchgeführt. Hierbei konnten nur Banden aus der Inkubation mit Δ NmSpry1 und den jeweiligen Wildtyp-E1A-Fusionsproteinen detektiert werden (vgl. Abb. 5A). Somit lässt sich die carboxyterminale Hälfte von Sprouty 1 (aa 173-313), die die Sprouty-Domäne enthält, als E1A-Interaktionsdomäne des Adenovirus-Serotyps 12 identifizieren. Ob Aminosäuresequenzen in der Sprouty-Domäne oder in der benachbarten Sequenz innerhalb der carboxyterminalen Hälfte von Sprouty 1 für die Interaktion mit E1A verantwortlich sind, wird zurzeit durch Mutationsanalysen untersucht.

Um zu zeigen, ob die E1A-Proteine auch mit weiteren Vertretern der Sprouty Proteinfamilie interagieren, wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Sprouty 2 und Sprouty 4 durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Interaktion von E1A mit Sprouty 4 im Vergleich zur Interaktion mit Sprouty 1 nicht allein vom Aminoterminal und der CR3-Domäne der E1A-Proteine des Adenovirus-Serotyps 12 abhängt (siehe Abb. 5B). Aus den Interaktionsstudien konnte eine starke Bande für die Interaktion zwischen E1A_{13S} und Sprouty 2 detektiert werden, die unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass die Interaktionsanalysen *in vitro* durchgeführt wurden, auf eine starke Affinität zurückgeführt werden kann. Eine Interaktion mit einer nur geringen Affinität ließ sich dagegen für Sprouty 2 mit E1A_{9,5} detektieren. Keine Bande zeigte sich bei der Interaktionsanalyse mit E1A_{12S}. Ebenso wie für Sprouty 1 konnte für Sprouty 2 keine Interaktion mit der Mutante Δ NE1A_{12S} gezeigt werden. Dagegen ließ sich aus den Experimenten mit Sprouty 4 sowohl eine Interaktion mit den drei E1A-Wildtyp-Proteinen wie auch mit der aminoterminalen Deletionsmutante Δ NE1A_{12S} nachweisen. Für Sprouty 4 konnte außerdem eine Bindung mit einer starken Affinität zu den Proteinen E1A_{13S} und E1A_{12S} detektiert werden. Dass die Unterschiede in der Bandenintensität nicht auf unterschiedliche Konzentrationen der GST-E1A-

Fusionsproteine zurückzuführen sind, wurde durch SDS-Polyacrylamidgele bestätigt, in denen die Quantität der eingesetzten GST-Fusionsproteine überprüft wurde (Abb. 5C).

Diese Daten zeigen, dass sowohl Sprouty 1 als auch Sprouty 2 und Sprouty 4 mit den Wildtyp-E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 *in vitro* interagieren. Die für die Bindung essentielle Domäne von Sprouty 1 liegt hierbei eindeutig in der C-terminalen Hälfte. Das ist der Bereich, in dem sich die konservierte Sprouty-Domäne befindet. Die für die Interaktion zu Sprouty 1 verantwortlichen E1A-Domänen liegen dagegen in der weitgehend konservierten aminoterminalen Region von E1A und in der CR3-Domäne. Für Sprouty 2 ließ sich keine Interaktion mit dem E1A_{12S}-Wildtyp-Protein und der aminoterminalen Deletionsmutante von E1A_{12S} feststellen. Die Interaktion mit Sprouty 4 ist dagegen nicht allein abhängig vom N-Terminus der E1A-Proteine. Eine mögliche Erklärung für die Affinitätsabweichungen der verantwortlichen interagierenden Proteindomänen von E1A zu den unterschiedlichen Sprouty-Proteinen, könnten in den strukturellen Unterschieden der Sprouty-Proteine liegen.

4.1.2 Das E1A_{13S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 2 interagiert mit Sprouty 1 *in vitro*

In den „GST-Pull-down-Analysen“ mit den E1A-Proteinen des hoch-onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 (Ad12) konnte eine Interaktion mit Sprouty 1, Sprouty 2 und Sprouty 3 gezeigt werden. Da es zwischen den E1A-Proteinen der Serotypen Sequenzunterschiede gibt, stellte sich die Frage, ob auch E1A-Proteine eines nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps in der Lage sind, mit den Sprouty-Proteinen zu interagieren. Daher wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit dem E1A_{13S}-Protein des nicht-onkogenen Adenovirus Serotyps 2 (Ad2) durchgeführt. Für das Experiment wurden HeLa-Zellen mit der cDNA für das Protein Sprouty 1 elektroporiert und das Zellextrakt, wie schon zuvor beschrieben, in die Interaktionsstudie mit den GST-Fusionsproteinen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde parallel ein Ansatz mit dem Fusionsprotein GST-Ad12-E1A_{13S} durchgeführt, und als Negativkontrolle wurde das GST-Protein verwendet. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, bindet Sprouty 1 auch an das E1A_{13S} Protein des nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps 2. Beim Vergleich der Banden der E1A-Proteine des hoch-onkogenen Adenovirustyps 12 und des nicht-onkogenen Adenovirus Serotyps 2 lässt sich eindeutig feststellen, dass Sprouty 1 nur

mit einer geringen Affinität mit dem E1A-Protein des nicht-onkogenen Adenovirus Serotyps 2 interagiert. Um die Intensität der detektierbaren Banden vergleichen zu können, wurde die Quantität der eingesetzten GST-E1A-Fusionsproteine über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 6B).

Diese Daten belegen, dass Sprouty 1 mit einer schwachen Affinität an das E1A_{13S}-Protein des nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps 2 bindet.

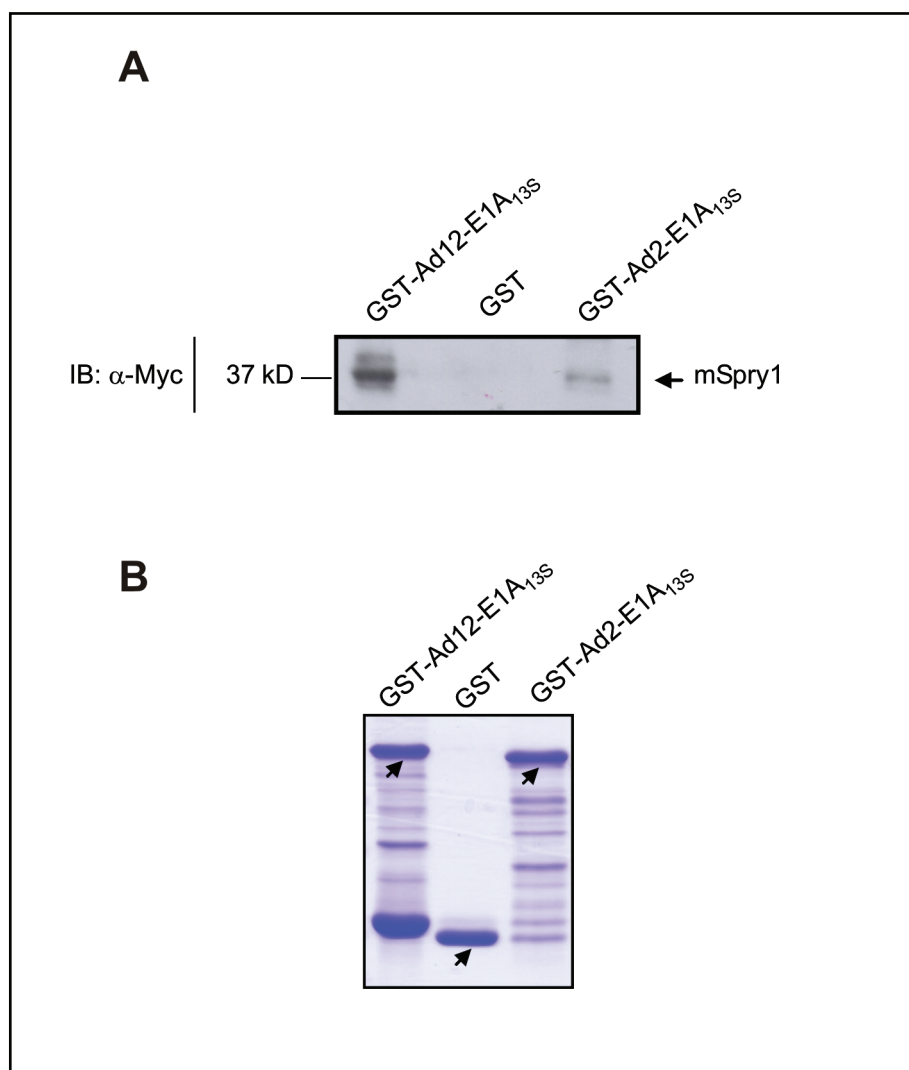


Abb. 6: Sprouty 1 interagiert mit dem E1A_{13S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 2. (A) Für die „GST-Pull-down-Analyse“ wurde das GST-Ad2-E1A_{13S}-Fusionsprotein mit Zellextrakt inkubiert, das überexprimiertes Sprouty 1-Protein (mSpry1) enthielt. Die interagierenden Proteine wurden über Immunoblot-Analysen unter Anwendung des Myc-Antikörpers detektiert. Als Positivkontrolle wurde ein „GST-Pull-down-Assay“ mit dem Fusionsprotein GST-Ad12-E1A_{13S} durchgeführt, und als Negativkontrolle wurde das GST-Protein mit dem Zellextrakt inkubiert. (B) Gleiche Aliquots der GST-E1A-Fusionsproteine wurden auf 12%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert, um vergleichbare Proteinkonzentrationen nachzuweisen.

4.1.3 Das E1A_{12S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 12 interagiert mit Sprouty 1 *in vivo*

Zur Untersuchung, ob eine Interaktion von E1A mit Sprouty *in vivo* nachgewiesen werden kann, wurden Immunpräzipitationen mit dem Zellextrakt aus transient transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit Expressionsvektoren für das Myc-Epitop gekoppelte E1A_{12S} und das Sprouty 1-Protein transfiziert. Gebildete Immunkomplexe wurden mit einem anti-mSpry1-Antikörper präzipitiert und anschließend im Western Blot mit einem anti-Myc-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurden HeLa-Zellen in parallelen Ansätzen entweder mit Vektoren für das E1A_{12S}-Myc-Fusionsprotein oder für das Sprouty 1-Protein transfiziert und die Zellextrakte in Immunpräzipitationsreaktionen analysiert. Wie Abb. 7 zeigt, führten die Immunpräzipitationen mit einem anti-mSpry1-Antikörper zu einer Kopräzipitation des adenoviralen Proteins E1A_{12S}.

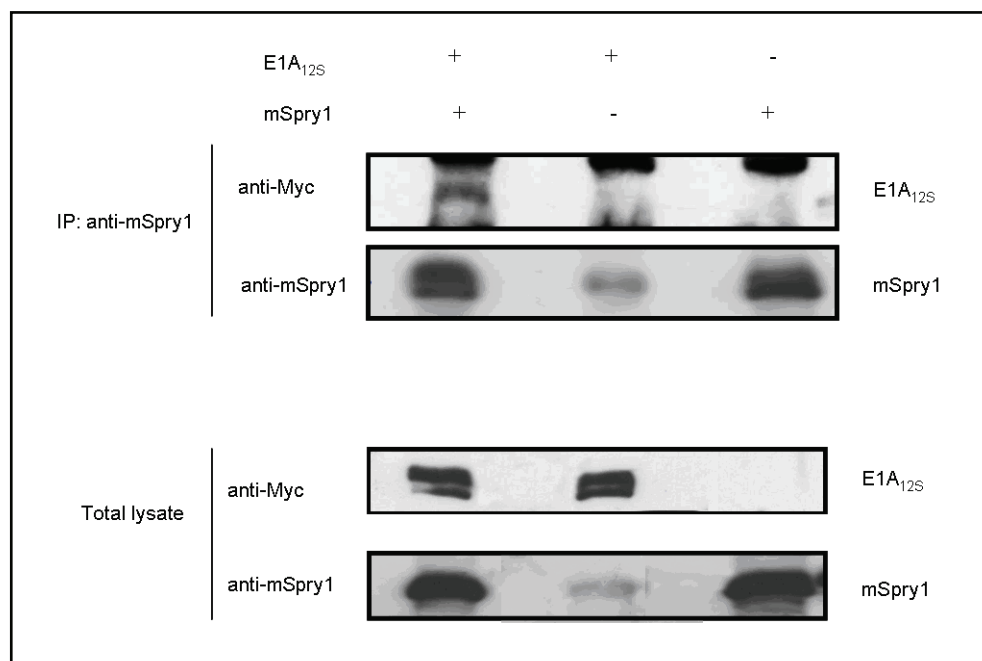


Abb. 7: Das Protein E1A_{12S} des Adenovirus-Serotyps 12 interagiert *in vivo* mit Sprouty 1. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das Myc-Epitop gekoppelte Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) E1A_{12S} Protein und für das Sprouty 1-Protein (mSpry1) wie angegeben transfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden mit einem anti-mSpry1-Antikörper inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf einem 15%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot mit einem anti-Myc-Antikörper analysiert. Zur weiteren Analyse wurden die Immunkomplexe mit einem mSpry1-Antikörper detektiert. Die Expression des E1A_{12S}- und mSpry1- Proteins wurde vor der Immunpräzipitation mittels Western Blot mit den angegebenen Antikörpern gegen das Myc-Epitop und gegen mSpry1 nachgewiesen (Lysatkontrolle).

In der Immunpräzipitations-Kontrolle, welche das exprimierte E1A_{12S}-Protein aufwies, konnte eine Bande für Sprouty 1 detektiert werden. Da der anti-mSpry1-Antikörper sowohl Maus- als auch Mensch-spezifisch reagiert, kann die detektierte Bande auf die endogene Expression des humanen Sprouty 1-Proteins zurückgeführt werden. Die Western Blot Analysen der für die Immunpräzipitation eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigen die Expression des E1A_{12S}- und Sprouty 1-Proteins (Lysatkontrolle). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das E1A_{12S}-Protein mit Sprouty 1 auch *in vivo* interagiert. Somit wurden die *in vitro* Ergebnisse, dass Sprouty 1 mit den E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 interagiert, *in vivo* bestätigt.

4.2 Die Spred-Proteine 1 und 2 interagieren nicht mit den E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12

Die Sprouty-Domäne wurde mittlerweile in einer Reihe von Proteinen und Proteinfamilien identifiziert, unter anderem findet man sie in der SOCS box (suppressor of cytokine signaling) Proteinfamilie (Hilton *et al.*, 1998; Master *et al.*, 2005), in dem Protein Pyrin (Papin *et al.*, 2007) und im BSPRY-Protein (B-box- und Sprouty-Domänen enthaltendes Protein) (van de Graaf *et al.*, 2006). Als zweit-prominentester Träger dieser konservierten Sequenz gelten jedoch die Spred-Proteine (Sprouty-related EVH1 [Ena/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) homology 1] domain) (als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004). Die Spred Proteinfamilie nimmt ebenso wie die Sprouty-Proteine regulierend Einfluss auf den RTK-Signalweg (Wakioka *et al.*, 2001). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten bestand die Möglichkeit, dass die Spred-Proteine ebenso wie die Sprouty-Proteine mit den adenoviralen E1A-Proteinen interagieren. Zur Aufklärung einer möglichen Interaktion wurden daher E1A-Interaktionsstudien mit den ca. 50 kDa großen Proteinen Spred 1 und Spred 2 durchgeführt. Die cDNA der verwendeten Maus Spred 1-Proteine (mSpred1) und Maus Spred 2-Proteine (mSpred2) wurden von Herr Prof. A. Yoshimura (Fukuoka, Japan) in dem Plasmid pcDNA3 zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Fusionsproteine mit einem 6 x Myc-Epitop exprimiert. Für die Protein-Protein-Interaktionsanalysen wurden GST-E1A-Fusionsproteine an Gluthationsepharose immobilisiert und mit zellulärem Lysat inkubiert, welches das jeweils überexprimierte

4.3 Das E7-Protein des humanen Papillomavirustyps 16 interagiert mit Sprouty 1

Das E7-Onkoprotein des humanen Papillomavirustyp 16 (HPV 16) weist Sequenzhomologien zu den adenoviralen E1A-Proteinen auf. Ebenso wie E1A ist das E7-Onkoprotein, neben dem E6-Onkoprotein der Papillomaviren, Hauptursache für das transformierende Potential der onkogenen Papillomavirustypen. Für das E7-Protein wurden eine Reihe von vergleichbaren Funktionen und Interaktionspartnern wie für die E1A-Proteine identifiziert (Dyson *et al.*, 1992; Chellappan *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wurde die Interaktion von E7 zu Sprouty 1 mittels „GST-Pull-Down-Analysen“ überprüft. Hierfür wurden GST-E7-Wildtyp-Fusionsproteine an Glutathionsepharose immobilisiert und mit zellulärem Lysat, welches das überexprimierte Sprouty 1-Protein enthielt, inkubiert. Mittels Immunoblot-Analysen unter Anwendung von anti-Myc-Antikörpern wurden die interagierenden Proteine detektiert. Die cDNA pGex-2T-HPV-E7 wurde über Frau Dr. K. Lowinski (Universitätsklinikum Essen) von Herrn Prof. D. J. McCance (New York, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der „GST-Pull-down-Analysen“ zeigten, dass Sprouty 1 an das E7-Onkoprotein von HPV 16 bindet (Abb. 9). Im Vergleich zu der Interaktion mit dem E1A_{13S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 12 scheint die Bindung zwischen E7 und Sprouty 1 etwas schwächer zu sein. Die „Kontrollgele“ zeigten zudem, dass vergleichbare Mengen an GST-Fusionsproteinen in den *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsanalysen eingesetzt wurden (vgl. Abb. 9B). Diese Daten belegen eine Interaktion zwischen Sprouty 1 und dem E7-Protein, das wie E1A als Onkoprotein für das transformierende Potential des Virus mitverantwortlich ist. Die Interaktionen mit E1A und E7 deuten darauf hin, dass Sprouty 1 ein zytoplasmatisches „Zielprotein“ für Onkoproteine dieser beiden DNA-Tumerviren ist um zellphysiologische Prozesse zu regulieren.

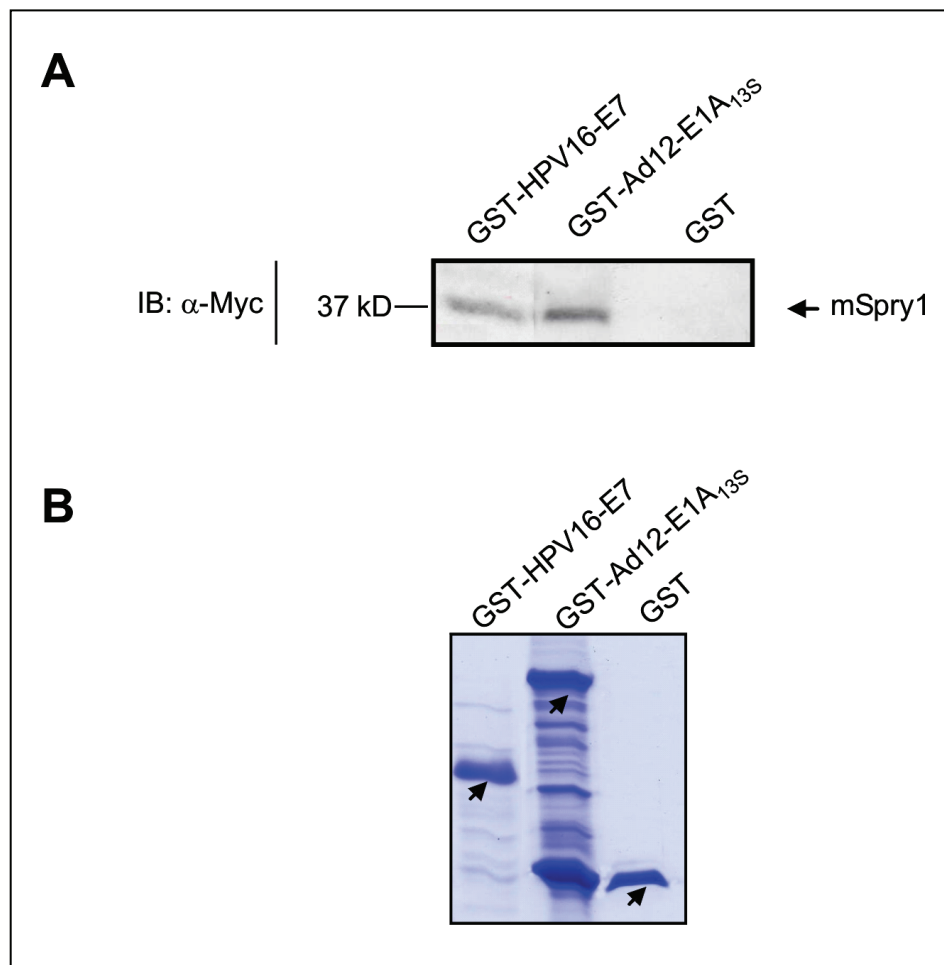


Abb. 9: Das E7-Protein des humanen Papillomavirustyps 16 interagiert mit Sprouty 1 *in vitro*. (A) Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsstudie wurde das GST-HPV16-E7-Fusionsprotein mit Zellextrakt inkubiert, welches überexprimiertes Sprouty 1-Protein (mSpry1) enthielt. Die interagierenden Proteine wurden eluiert, auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Verwendung eines Myc-Antikörpers detektiert. Als Positivkontrolle wurde mit dem Fusionsprotein GST-Ad12-E1A_{13S} und als Negativkontrolle mit dem GST-Protein ein „GST-Pull-down-Assay“ durchgeführt. (B) Gleiche Aliquots der eingesetzten GST-E1A-Fusionsproteine wurden auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung zur quantitativen Kontrolle detektiert.

4.4 Sprouty 1 kolokalisiert mit E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 im Zytoplasma

Die Ergebnisse aus den „GST-Pull-down-Analysen“ belegen, dass die adenoviralen E1A-Proteine mit den Sprouty-Proteinen *in vitro* interagieren. Mittels Immunpräzipitation wurde exemplarisch eine Interaktion *in vivo* für Sprouty 1 und das E1A_{12S}-Protein gezeigt. Die Bestimmung der zellulären Lokalisation interagierender

Proteine kann zu Hinweisen führen, die zur Aufklärung einer möglichen funktionellen Konsequenz dieser Interaktion beitragen. Um die zelluläre Lokalisation der Protein-Protein-Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

Zum Studium auftretender Lokalisationsveränderungen von Sprouty 1 und E1A_{13S}, die sich als Konsequenz aus dieser Interaktion ergeben, wurden zuvor HeLa-Zellen mit Expressionsvektoren entweder für das Sprouty 1-Protein oder für das Myc-Epitop gekoppelte E1A_{13S}-Protein transient transfiziert. Da für Sprouty 1 eine inhibitorische Funktion innerhalb des aktivierten FGFR- (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor) Signalweges gezeigt werden konnte, wurden die transfizierten Zellen selektiv mit einem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) stimuliert (Gross *et al.*, 2001). Hierfür wurden die Zellen 14 h nach der Transfektion auf sterile Glasdeckgläschen ausgesät und für 24 h in Serum-reduziertem-Medium (statt 10% Fötales Kälberserum (FKS) wurden dem DMEM-Medium 0,5% Serum zugesetzt) inkubiert. Im Anschluss wurden die „hungrigen Zellen“ zur Induktion des FGFR-Signalweges für 2 h mit 20ng/ ml bFGF stimuliert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Präparate mit spezifischen Antikörpern gegen Sprouty 1 oder gegen das Myc-Epitop des Fusionsproteins E1A_{13S}-Myc inkubiert. Die zelluläre Verteilung dieser Proteine wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops analysiert.

In Abb. 10 sind exemplarische Ergebnisse aus den Transfektionen mit Sprouty 1 cDNA oder der cDNA für E1A_{13S} dargestellt. Für Sprouty 1 (grün) lässt sich eine zelluläre Verteilung über das gesamte Zytoplasma der HeLa-Zellen erkennen. Hierbei kann man vereinzelt Anreicherungen von Sprouty 1 in vesikelartigen Zellkompartimenten detektieren. Aus den Immunfluoreszenzaufnahmen der Abb. 10B lässt sich erkennen, dass E1A_{13S} (rot) zwar hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist, jedoch auch im Zytoplasma vereinzelt nachgewiesen werden kann.

Zur Analyse einer Kolo-kalisation wurden HeLa-Zellen mit Expressionsvektoren für das Sprouty 1-Protein und das Myc-Epitop gekoppelte E1A_{13S}-Protein transient kotransfiziert. Für die Immunfluoreszenzauswertung wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt.

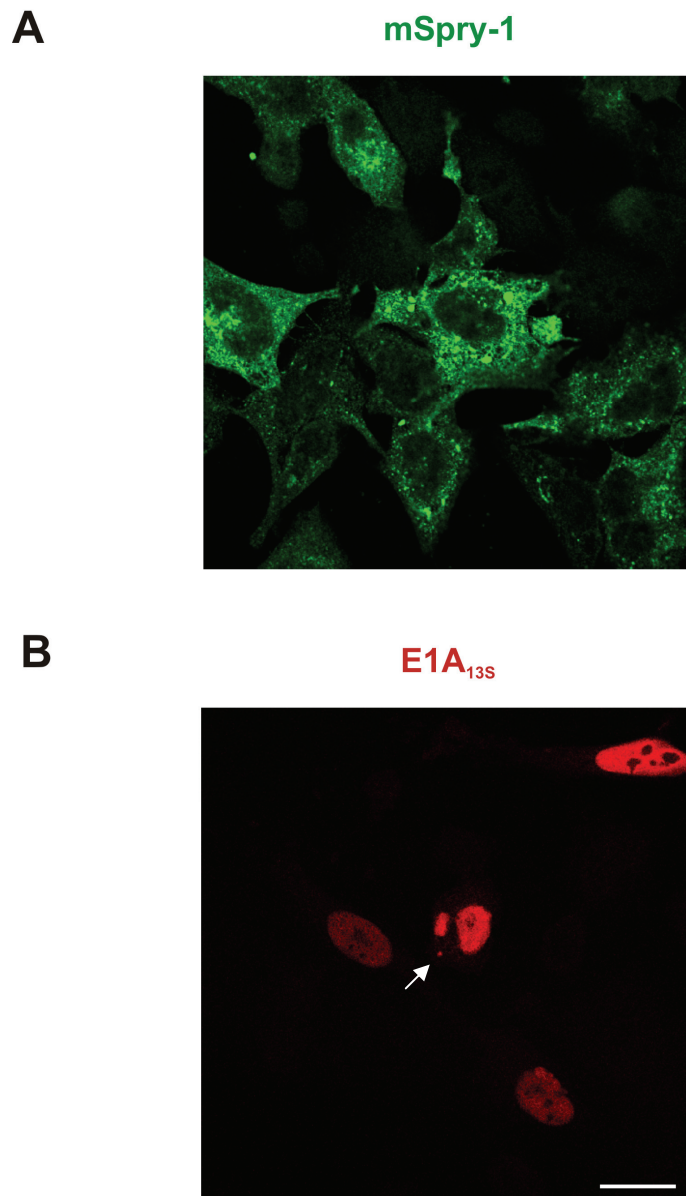


Abb. 10: Zelluläre Lokalisation von Sprouty 1 (mSpry1) und E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für das mSpry1-Protein (A) oder das Myc-Epitop gekoppelte E1A_{13S}-Protein transfiziert (B). Die Zellen wurden 14 h nach der Transfektion auf sterile Glasdeckgläschen ausgesät und für 24 h in Serum-reduziertem-Medium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert. Nach Inkubation mit 20ng/ ml bFGF für 2 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenzuntersuchung analysiert. Zur Detektion von Sprouty 1 wurde der anti-Spry1 Primärantikörper verwendet, und für die Detektion von Myc-Epitop gekoppeltem E1A_{13S}-Protein wurde der anti-Myc Primärantikörper eingesetzt. Der Pfeil markiert zytoplasmatisch lokalisiertes E1A_{13S}-Protein. Maßstabsbalken = 10 µm.

Der Nachweis einer Kolokalisation von E1A_{13S} mit Sprouty 1 ist exemplarisch in Abb. 11 und 12 dargestellt. Eine zytoplasmatische Verteilung von Sprouty 1 nach Stimulierung mit bFGF in kotransfizierten HeLa-Zellen kann eindeutig in den Abb. 11A, 11D und 12A festgestellt werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen außerdem, dass Sprouty 1 auch in kotransfizierten Zellen mit E1A_{13S} über das gesamte Zytoplasma lokalisiert ist. Hierbei lässt sich zudem eine Anreicherung von Sprouty 1 in vesikelartigen Zellkompartimenten feststellen. Impagnatiello und Mitarbeiter konnten nach FGF2-Stimulierung in humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC-Zellen) eine Akkumulation von Sprouty 1-Proteinen an der Plasmamembran zeigen (Impagnatiello *et al.*, 2001). In HeLa-Zellen ließ sich eine konzentrierte Ansammlung von Sprouty 1-Proteinen an der Plasmamembran nach bFGF-Stimulierung nur vereinzelt feststellen, was exemplarisch in Abb. 12D zu erkennen ist.

Der größte Anteil an exprimierten E1A_{13S}-Proteinen wurde in mit Sprouty 1 kotransfizierten HeLa-Zellen im Zellkern detektiert (siehe Abb. 11B, 11E und 12B). Eine zytoplasmatische Anreicherung in vesikelartigen Zellkompartimenten konnte jedoch auch für E1A_{13S} gezeigt werden. Aus den Überlagerungen der aufgenommenen Immunfluoreszenzbilder für Sprouty 1 und E1A_{13S} (vgl. Abb. 11C, 11F und 12C und 12D) lässt sich deutlich eine Kolokalisation innerhalb der vesikelartigen Zellkompartimente von Sprouty 1 und E1A_{13S} im Zytoplasma erkennen (gelb). Zur Aufklärung, ob eine konzentrierte Akkumulation von Sprouty 1 an der Plasmamembran zu einem früheren und späteren Zeitpunkt nach Stimulationsbeginn mit bFGF detektiert werden kann und ob eine zeitabhängige Kolokalisationsveränderung stattfindet, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, in denen die Inkubationsdauer mit bFGF verkürzt bzw. verlängert wurde (30 min – 9 h). Hierbei ließ sich jedoch kein Unterschied zu den hier aufgeführten Immunfluoreszenzaufnahmen erkennen (Daten nicht gezeigt).

Der durch die Immunfluoreszenzuntersuchungen detektierte Assoziationsnachweis von E1A_{13S} mit Sprouty 1 im Zytoplasma stützt die voran gegangenen *in vitro* und *in vivo* Interaktion-Ergebnisse. Die Kolokalisation beider Proteine lässt sich hierbei nur im Zytoplasma und nicht im Zellkern detektieren.

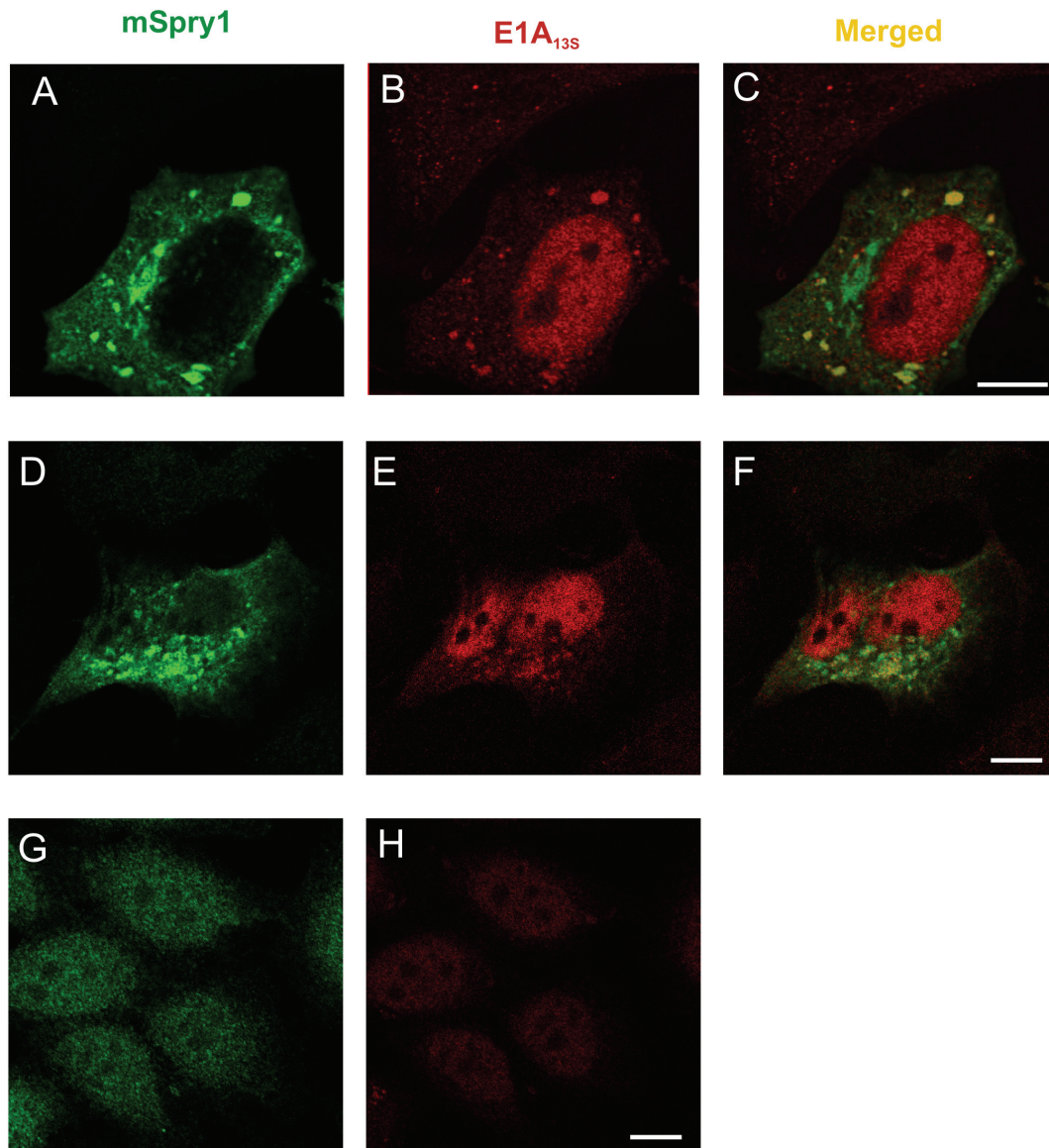


Abb. 11: Sprouty 1 (mSpry1) kolokalisiert mit E1A_{13S} im Zytoplasma. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für das mSpry1-Protein und das Myc-Epitop gekoppelte E1A_{13S}-Protein transfiziert. Die Zellen wurden 14 h nach der Transfektion auf sterile Glasdeckgläschen ausgesät und für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert. Nach einer Inkubation von 2 h mit 20ng/ ml bFGF wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenzuntersuchung analysiert. (A, D) Immunfluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Verteilung von mSpry1 (grün). Zur Detektion wurde anti-Spry1 als Primärantikörper verwendet. (B, E) Immunfluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Verteilung von E1A_{13S} (rot). Zur Detektion des Myc-Epitop gekoppelten E1A_{13S}-Proteins wurde ein anti-Myc-Antikörper verwendet. (C, F) Überlagerung der einzelnen Bilder (Merged). Kolokalisationen sind aufgrund der Überlagerung in gelb dargestellt. (G, H) Die Zellen wurden in Kontrollexperimenten mit dem Leervektor pcR3.1 transfiziert. Maßstabsbalken = 10 µm.

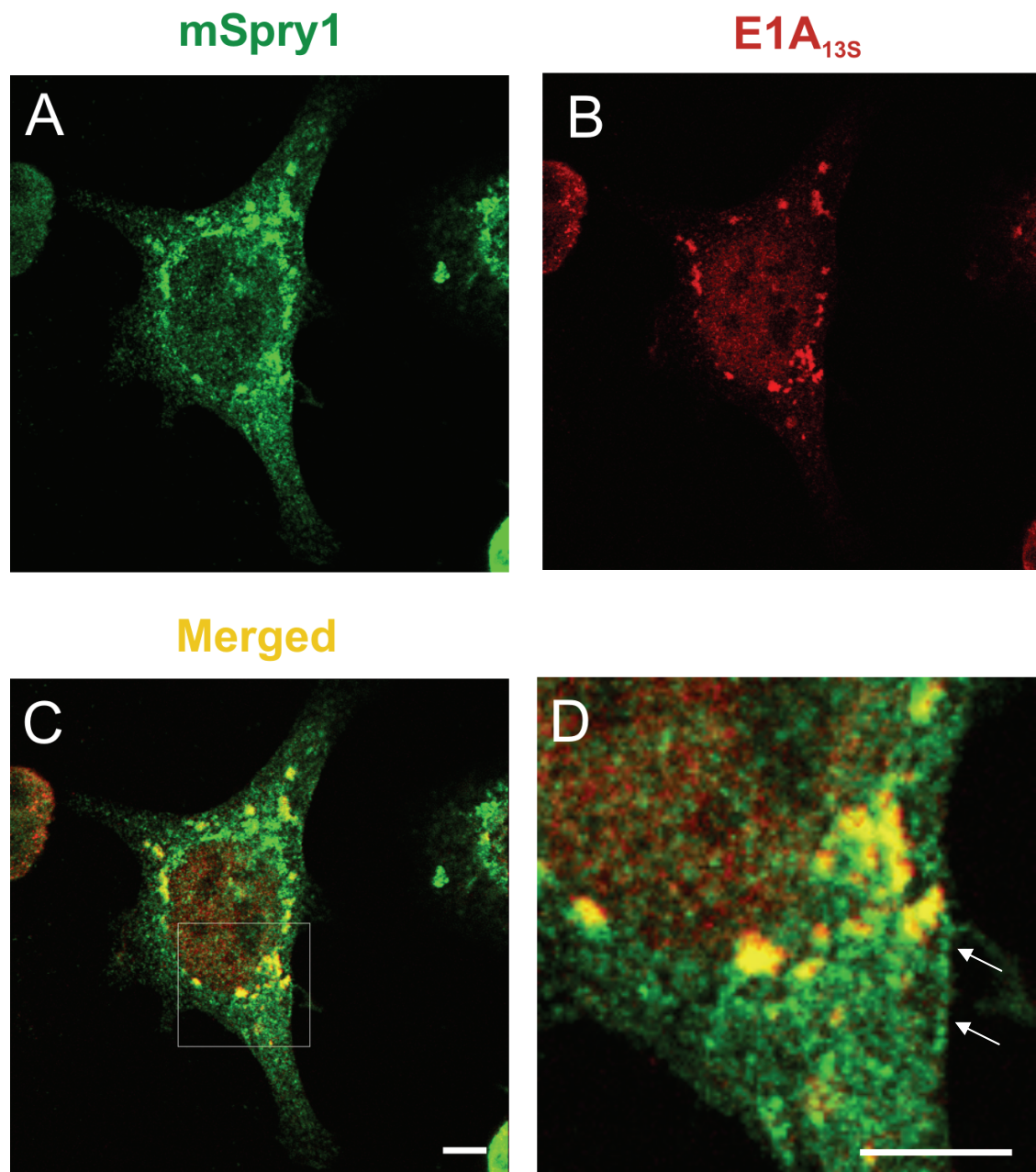


Abb. 12: Zytoplasmatische Verteilung von Sprouty 1 (mSpry1) und Kolokalisationsnachweis mit E1A_{13S}. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für mSpry1 und E1A_{13S}-Myc transfiziert. Die Zellen wurden 14 h nach der Transfektion auf sterile Glasdeckgläschen ausgesät und für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert. Nach einer Stimulierung mit 20ng/ ml bFGF für 2 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen analysiert. (A) Immunfluoreszenzaufnahme der intrazellulären Verteilung von mSpry1 (grün). Zur Detektion wurde anti-Spry1 als Primärantikörper verwendet. (B) Immunfluoreszenzaufnahme der intrazellulären Verteilung von E1A_{13S} (rot). Zur Detektion des Myc-Epitop gekoppelten E1A_{13S}-Proteins wurde der anti-Myc-Antikörper eingesetzt. (C) Überlagerung der einzelnen Bilder (Merged). Kolokalisationen sind aufgrund der Überlagerung in gelb dargestellt. (D) Vergrößerte Darstellung des in Abb. C eingegrenzten Bereichs. Die Pfeile markieren Anreicherungen von Sprouty 1 an der Plasmamembran. Maßstabsbalken = 5 µm.

4.5 Analyse funktioneller Konsequenzen der Interaktion von E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1

Zwar zeigen die vorangegangenen Experimente eine Interaktion zwischen den zellulären Sprouty-Proteinen und den adenoviralen E1A-Proteinen, jedoch bleibt fraglich, welche funktionelle Konsequenz aus dieser Interaktion resultiert. Da die Genexpression sowohl durch das Eingreifen der Sprouty-Proteine in den RTK-Signalweg als auch durch die Interaktion von E1A_{13S} mit Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, wurden über transiente Expressionsanalysen die Auswirkungen der koexprimierten Proteine auf die Aktivierung von Responseelementen sowie den ERK1/2-Kinasen untersucht.

4.5.1 Sprouty 1 hemmt die E1A_{13S}-induzierte Aktivierung des TPA responsive element (TRE)

Zum Studium einer funktionellen Konsequenz der Interaktion von E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1 wurden Luciferase Reporter Assays durchgeführt. Das adenovirale E1A_{13S}-Protein transaktiviert das TPA *responsive element* (TRE). Diese DNA-Konsensussequenz, an die verschiedene AP-1-Komplexe binden, lässt sich in der Promotorsequenz einer Vielzahl von Genen nachweisen. In Kotransfektions-Studien konnte gezeigt werden, dass E1A_{13S} mit cJun kooperiert und somit die TRE-Sequenz transaktiviert wird (Kitabayashi *et al.*, 1990; de Groot *et al.*, 1991). Zur Untersuchung, ob die E1A_{13S}-induzierte Aktivierung der TRE-Sequenz durch die Interaktion mit Sprouty 1 beeinflusst wird, wurden transiente Expressionsanalysen in HeLa-Zellen durchgeführt. Als Reporterkonstrukt wurden drei Kopien der Kollagenase-TRE-Sequenz (ColTRE) mit dem Promotor der Herpes simplex Virustyp 1 Thymidinkinase ligiert (3xColTRE-tk) und in den Luciferase Reportervektor pGL3 kloniert (siehe Abb. 13 und 14A). HeLa-Zellen wurden mit dem Luciferase Reportervektor und den Expressionsvektoren für Sprouty 1 bzw. für das E1A_{13S}-Protein transient kotransfiziert. 14 h nach der Transfektion erhielten die Zellen frisches DMEM-Vollmedium und wurden nach weiteren 49 h geerntet, und die

Enzymaktivität in dem Zelllysats bestimmt. Eine Zellernte 63 h nach der Transfektion erzielte in Vorversuchen höhere Intensitäten, als zu einem früheren Erntezeitpunkt.

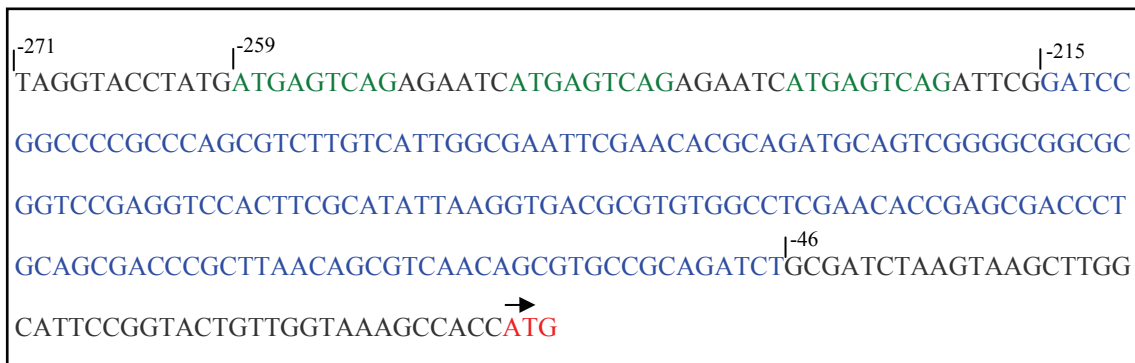


Abb. 13: Nukleotidsequenz des Promotorelements 3xColTRE-tk im Luciferase Reportervektor pGL3. Die Nukleotidsequenz des Luciferase Reportervektors 3xColTRE-tk-pGL3 ist von nt -271 bis zum Transkriptionsstartpunkt (in rot dargestellt und mit einem Pfeil markiert) angegeben. Die 3x Sequenz des TPA responsive element der Kollagenase (3xColTRE) ist in grün und der Promotor der Herpes simplex Virustyp 1 Thymidinkinase (tk) in blau dargestellt.

De Groot und Mitarbeiter konnten zeigen, dass E1A_{13S} in Kooperation mit cJun transaktivierend auf das TRE-Responseelement wirkt (de Groot *et al.*, 1991). Daher wurden transiente Koexpressionsstudien mit einem Expressionsvektor für das cJun-Protein durchgeführt. In Abb. 14B lässt sich erkennen, dass die TRE-Aktivierung in HeLa-Zellen bei Expression von exogenem cJun auf das 1,7-fache der relativen Luciferase Aktivität ansteigt. Dagegen zeigte sich bei Koexpression von E1A_{13S} und cJun eine 6,4-fach-induzierte TRE-Aktivierung. Die gleichzeitige Expression von Sprouty 1 führte sowohl zu einer verringerten cJun-induzierten TRE-Aktivierung, als auch zu einer Verringerung der E1A_{13S} und cJun-koinduzierten Transaktivierung, die um mehr als ein Drittel gehemmt wurde.

Eine Transfektion mit der cDNA von Sprouty 1 ohne E1A_{13S} und cJun führte im Vergleich zur Basalaktivität zu einer um die Hälfte verringerten Luciferase Expression (siehe Abb. 14C). Sprouty 1 wirkt somit repressorisch auf die reine Basalaktivierung des TRE-Responseelements. Eine Aktivierung des 3xColTRE-tk-Luciferase Reporterkonstrukts durch E1A_{13S} ohne exogenes cJun führte nur zu einem geringen Anstieg der Genexpression in HeLa-Zellen, was vermutlich auf endogenes cJun zurückgeführt werden kann. In Kotransfektionsstudien mit der cDNA für E1A_{13S} und Sprouty 1 konnte eine verringerte E1A_{13S}-induzierte Genexpression festgestellt werden, die außerdem unterhalb der Basalaktivität lag. Mit Hilfe eines Western Blots wurde die Expression der Genprodukte für E1A_{13S}, Sprouty 1 und cJun überprüft.

A

3xColTRE-tk Reporterkonstrukt

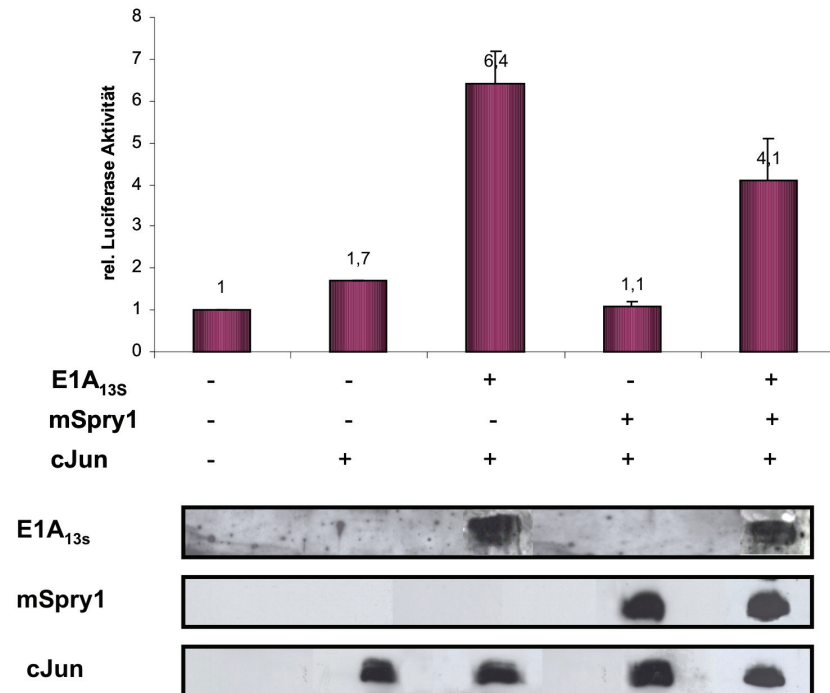
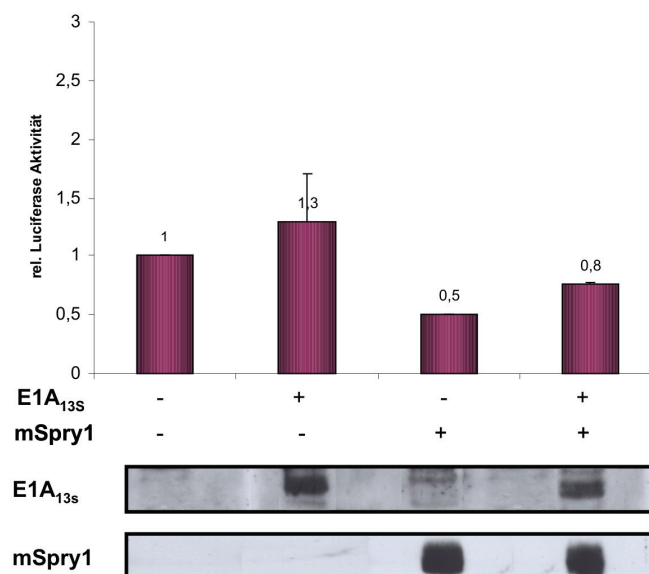
**B****C**

Abb. 14: Die Aktivierung des TRE-Responseelements wird durch E1A_{13S} und Sprouty 1 (mSpry1) beeinflusst. (A) Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstrukts 3xColTRE-tk. **(B)** und **(C)** HeLa-Zellen wurden mit 0,5 µg des Luciferase Reportervektors 3xColTRE-tk-pGL3 und jeweils 0,5

µg der verschiedenen Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die transfizierte Gesamt-DNA blieb durch entsprechende Zugabe des Leervektors konstant bei 2 µg. 63 h nach Transfektionsende wurde die Luciferase-Enzymaktivität bestimmt. Die relativen Luciferase Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus Doppelbestimmungen und sind hier repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Transfektionsexperimente dargestellt. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts 3xColTRE-tk-Luc in Anwesenheit des Leervektors pcR3.1 wurde als 1 normiert. Die Expression der untersuchten Genprodukte E1A_{13S}, mSpry1 und cJun in den Gesamtzellextrakten wurde mittels Western Blot mit einem anti-Ad12E1A-Antiserum und unter Anwendung der spezifischen Antikörper anti-Sprouty 1 und anti-cJun analysiert.

Die Unterschiede der E1A_{13S}-induzierten TRE-Aktivierung in Abhängigkeit von der cJun-Expression zeigen, wie entscheidend die anwesenden Kofaktoren im Zellkern Einfluss auf die transaktivierende Funktion der E1A-Proteine nehmen können. Unabhängig von der cJun-Expression inhibiert Sprouty 1 sowohl die Basalaktivität des TREs als auch die E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung.

4.5.2 Die E1A_{13S}-induzierte Aktivierung des *serum response element* (SRE) wird durch Sprouty 1 inhibiert

Zur weiteren funktionellen Analyse der Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 wurden Luciferase Reporter Assays mit einem Reportervektor, welcher das *serum response element* (SRE) in 5 Kopien enthält (Firma Stratagene, vgl. Abb. 15A), durchgeführt. Das SRE wird als Modell zum Studium der Transkriptionskontrolle durch Wachstumsfaktoren verwendet (Treisman, 1995). In transienten Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass Sprouty die Aktivierung des SREs nach Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor bFGF reprimiert (Gross *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2005). Zur Analyse der SRE-Aktivierung wurden die Zellen 14 h nach Transfektionsende für weitere 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (statt 10 % FKS wurden dem DMEM-Medium 0,5 % Serum zugesetzt) inkubiert. Im Anschluss wurden die „hungernden Zellen“ zur Aktivierung des RTK-Signalweges durch Zugabe von 10 % FKS im Medium induziert, nach 1 bis 9 h Inkubationsdauer geerntet und die Enzymaktivität in den Zelllysaten bestimmt.

Die relative Luciferase Aktivität nach Transfektion des Luciferase Reportervektors wurde als 1 normiert. 1 h nach Stimulierung mit FKS zeigte sich noch keine E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung des SREs. Nach einer Stimulierung von 5 bis 9 h ließ sich dagegen eine erhöhte SRE-Aktivierung durch E1A_{13S} detektieren. Hierbei

konnte nach 7 h die höchste Transaktivierung, d.h. ein Anstieg um bis das Dreifache der Basalaktivität, durch E1A_{13S} festgestellt werden (siehe Abb. 15B). Die Expression von Sprouty 1 wies dagegen nur nach einer einstündigen Stimulierung eine Inhibierung der basalen SRE-Aktivierung (um ca. 60 %) auf. Zu einem späteren Erntezeitpunkt führte die Expression von Sprouty 1 nicht zu einer Reduktion der Basalaktivität, was vermutlich auf neu entstandene Genprodukte zurückgeführt werden kann, welche die Funktion von Sprouty 1 beeinflussen. Die Koexpressionsanalysen zeigten eine durch Sprouty 1 verringerte E1A_{13S}-induzierte Genexpression über die gesamte FKS-Inkubationsdauer von 9 h, wie sie zuvor für die Expressionsstudien mit dem TRE-Promotor gezeigt wurden (vgl. Kap. 4.5.1). Nach 9 h ist die Inhibition durch Sprouty 1 nur noch gering und nicht mehr signifikant (von 2,5 auf 2,3 der relativen Luciferase Aktivität).

Die Inkubation mit 10 % FKS führt zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die als Konsequenz mit der Expression unterschiedlicher zellulärer Genprodukte einhergeht. Dass Sprouty 1 zeitabhängig eine veränderte Aktivierung aufweist, lässt sich vermutlich auf die Interaktion mit neu entstandenen Genprodukten zurückführen. Eine Verzögerung der E1A_{13S}-induzierten SRE-Aktivierung nach 1h kann vermutlich durch einen Mangel an Kofaktoren im Zellkern erklärt werden.

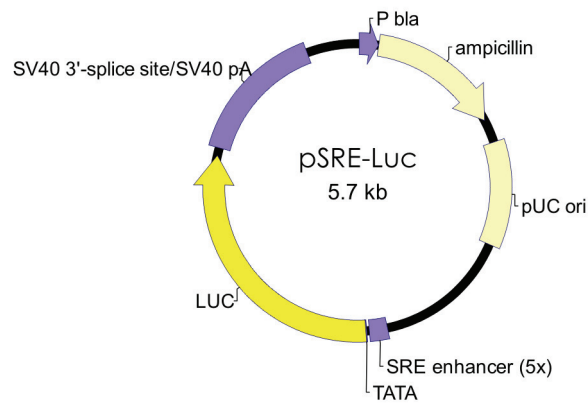
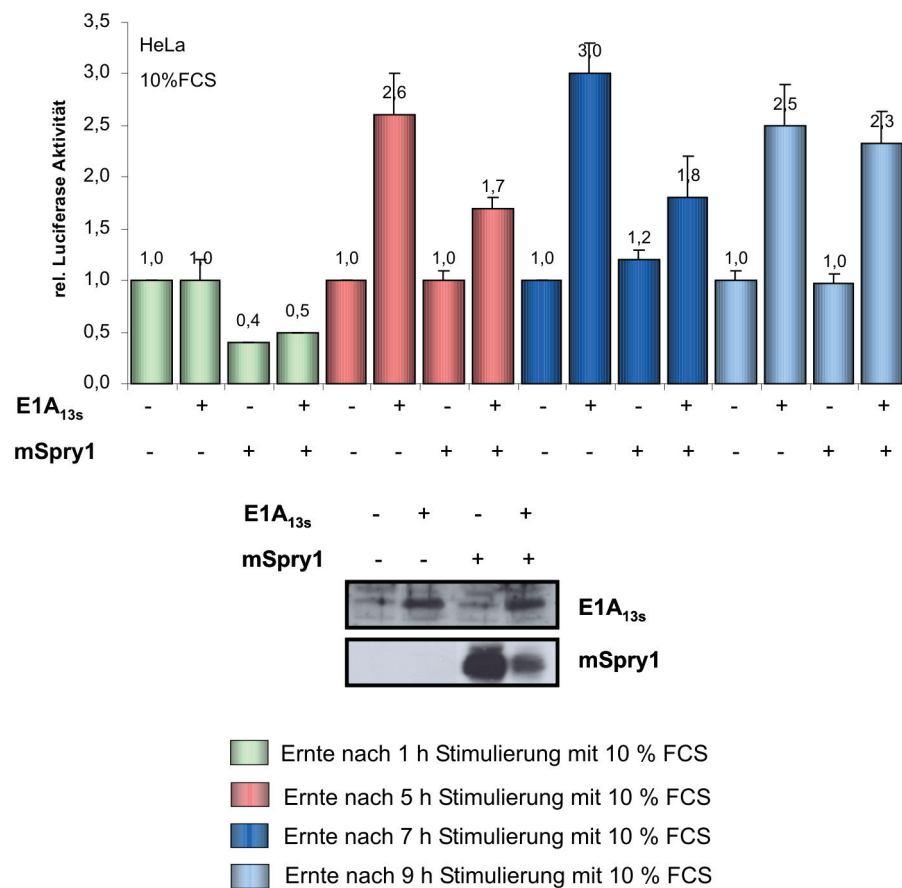
A**B**

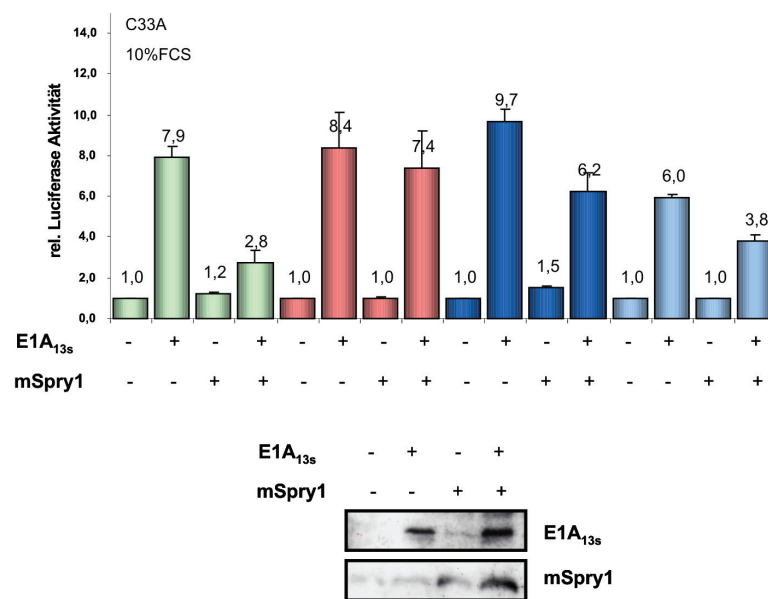
Abb. 15: Die E1A_{13s}-induzierte SRE-Aktivierung wird durch Sprouty 1 (mSpry1) in HeLa-Zellen inhibiert. (A) Darstellung des Luciferase Reportervektors pSRE-Luc (Stratagene). (B) HeLa-Zellen wurden mit 1 µg des Luciferase Reportervektors pSRE-Luc und jeweils 0,5 µg der verschiedenen Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Für die Transfektion wurden konstant 2 µg Gesamt-DNA pro Ansatz eingesetzt und die Menge entsprechend durch Zugabe des Leervektors eingestellt. 14 h nach Transfektionsende wurden die Zellen für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5% Serum im

DMEM-Medium) inkubiert. Nach einer Stimulierung mit 10 % FKS für 1 bis 9 h (siehe die entsprechende farbliche Markierung) wurden die Zellextrakte geerntet und die Luciferase-Enzymaktivität bestimmt. Die relativen Enzymaktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus Doppelbestimmungen und sind hier repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Transfektionsexperimente dargestellt. Die Promotoraktivität der Reportersequenz des SRE in Anwesenheit des Leervektors pcR3.1 wurde als 1 normiert. Zur Kontrolle der exprimierten E1A_{13S}- und mSpry1-Proteine in den Gesamtzellextrakten wurden Western Blot Analysen durchgeführt und die Proteine mittels eines anti-Ad12E1A-Antiserums und unter Anwendung des Antikörpers anti-Sprouty 1 detektiert (exemplarisch dargestellt).

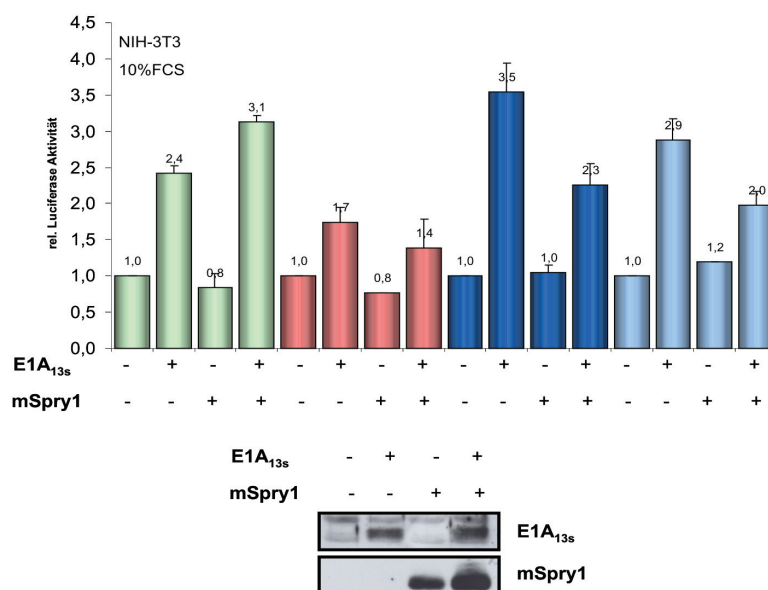
Da die Funktionen der Sprouty-Proteine abhängig vom Zelltyp variieren können, wurden zur weiteren Analyse Luciferase Assays in C33A- und NIH-3T3-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 16). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den HeLa-Zellen zeigte die E1A_{13S}-induzierte Genexpression in C33A-Zellen schon nach 1 h eine Aktivierung um das 7,9-fache. Nach 7 h ließ sich ein Anstieg der Aktivierung um ca. das 10-fache detektieren. Die Koexpression von E1A_{13S} und Sprouty 1 führte zu einer Verringerung der E1A_{13S}-induzierten Aktivierung von SRE. Die Reduktion war schon nach 1h um fast zwei drittel und nach 9 h noch um mehr als ein Drittel messbar. Eine Reduktion der Basalaktivität durch Sprouty 1 konnte in C33A-Zellen nicht detektiert werden.

Ebenso wie in der humanen epitheloiden Zervix-Karzinomzelllinie C33A konnte in der Maus-Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 schon nach 1 h eine Aktivierung des SRE-Responseelements durch E1A_{13S} detektiert werden (siehe Abb. 16B). Eine E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung zeigte sich über die gesamte Inkubationsdauer von 9 h, wobei das Maximum (3,5 der relativen Luciferase Aktivität) wie bei den HeLa- und C33A-Zellen nach 7 h erreicht wurde. Eine Reduktion der E1A_{13S}-induzierten SRE-Aktivierung durch Sprouty 1 ließ sich erst nach 5 h feststellen. Die stärkste Inhibition der E1A_{13S}-Transaktivierung durch Sprouty 1 wurde nach 7 und 9 h detektiert und zeigte eine ca. 30 %ige Reduktion der E1A_{13S}-induzierten Genexpression. Eine Inhibierung der Basalaktivität durch Sprouty 1 konnte nur nach 1 und 5 h detektiert werden. Immunoblot-Analysen bestätigen die Expression von E1A_{13S} und Sprouty 1 in den transfizierten Zellen.

A



B



- Ernte nach 1 h Stimulierung mit 10 % NCS
- Ernte nach 5 h Stimulierung mit 10 % NCS
- Ernte nach 7 h Stimulierung mit 10 % NCS
- Ernte nach 9 h Stimulierung mit 10 % NCS

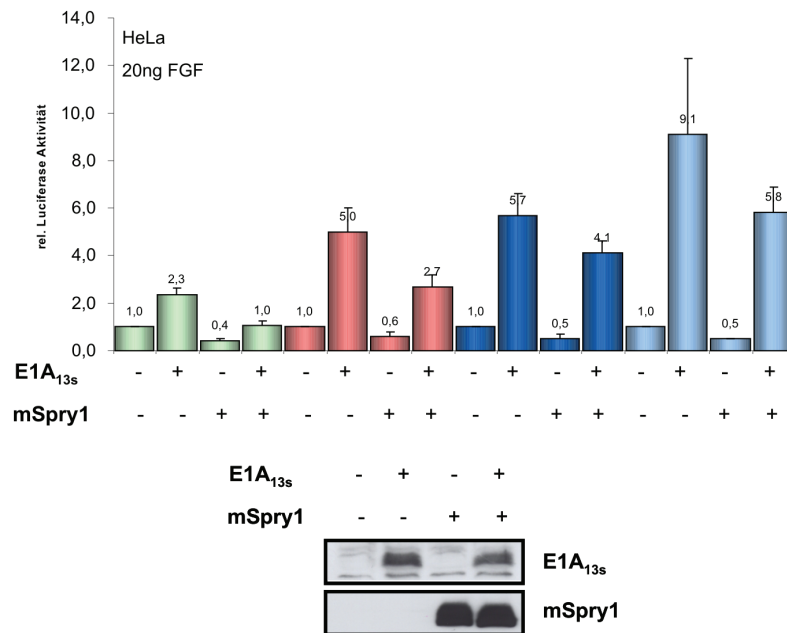
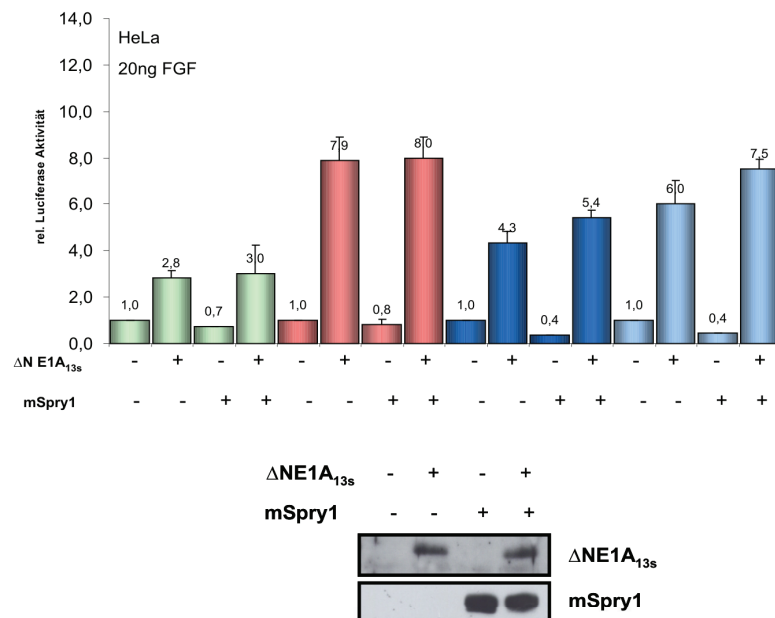
Abb. 16: Die E1A_{13s}-induzierte SRE-Aktivierung wird durch Sprouty 1 in C33A- und NIH-3T3-Zellen inhibiert. Zur Analyse der SRE-Aktivierung wurden die Zellen mit 1 µg des Luciferase Reportervektors pSRE-Luc und jeweils 0,5 µg der verschiedenen Expressionsvektoren wie angegeben kointransfiziert. Durch entsprechende Zugabe des Leervektors pcR3.1 wurde die Gesamt-DNA-Menge bei 2 µg konstant gehalten. 14 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Serum-reduziertem Vollmedium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert. Nach einer Stimulierung mit 10 % FCS für 1 bis 9 h (siehe die entsprechende farbliche Markierung) wurden die Zellextrakte geerntet und die Luciferase-Enzymaktivitäten bestimmt. Die relativen Enzymaktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus

Doppelbestimmungen und sind hier repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Transfektionsexperimente dargestellt. Die Promotoraktivität der Reportersequenz des SRE in Anwesenheit des Leervektors pcR3.1 wurde als 1 normiert. Zur Kontrolle der exprimierten E1A_{13S}- und Sprouty 1-Proteine (mSpry1) in den Gesamtzellextrakten wurden Western Blot Analysen durchgeführt und die Proteine mittels eines anti-Ad12E1A-Antiserums und unter Anwendung des Antikörpers anti-Sprouty 1 detektiert (exemplarisch dargestellt). (A) Luciferase Reporter Ergebnisse aus C33A-Zellen. (B) Luciferase Reporter Ergebnisse aus NIH-3T3-Zellen.

Zusammengefasst zeigen die transienten Expressionsanalysen in den drei Zelllinien HeLa, C33A und NIH-3T3 eine E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung des SRE-Responseelements, die durch Sprouty 1 um mehr als 50 % reduziert werden kann. Die Intensitätsunterschiede der Transaktivierung durch E1A_{13S} und der inhibitorischen Ausprägung von Sprouty 1 zwischen den Zelllinien, lässt sich vermutlich auf die zelltypspezifisch intrazellulär aktiven Proteine zurückführen

Da die Stimulierung mit 10 % FKS zu der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führt, die sich gegenseitig z. T. durch „Überkreuzungsinteraktionen“ beeinflussen, wurden transiente Expressionsanalysen mit dem Wachstumsfaktor bFGF durchgeführt, der gezielt den FGFR-Signalweg aktiviert. Hierbei konnte eine konstante Inhibition der E1A_{13S}-induzierten Transaktivierung des SREs durch Sprouty 1 festgestellt werden (siehe Abb. 17A). Für eine gezielte Aktivierung des FGFR-Signalweges wurden transfizierte HeLa-Zellen nach dem „Serumentzug“ für 1 bis 9 h mit 20ng/ ml bFGF inkubiert und entsprechend geerntet. Die Stimulierung mittels bFGF führte in HeLa-Zellen schon nach 1 h zu einer Aktivierung durch E1A_{13S} um das 2,3-fache, die mit der Zeit weiter anstieg. Nach 9 h konnte ein Maximum von 9,1 der relativen Luciferase Aktivität detektiert werden. Die Koexpression von E1A_{13S} und Sprouty 1 führte zu einer konstanten Inhibition der E1A_{13S}-induzierten Genexpression. Ähnlich wie in den Experimenten mit 10 % FKS wies Sprouty 1 nach bFGF-Stimulierung die stärkste inhibitorische Wirkung nach 1 h auf. Im Vergleich zur Stimulierung mit 10 % FKS führte die Expression von Sprouty 1 nach bFGF-Stimulierung zu einer konstanten Inhibition der Basalaktivität von ca. 50 % über die gesamte Inkubationsdauer von 9 h. Diese Ergebnisse zeigen eine spezifische, konstante Inhibition der E1A_{13S}-induzierten SRE-Aktivierung durch Sprouty 1 innerhalb des aktivierten FGFR-Signalweges.

In den *in vitro* Interaktionsstudien ließ sich für die Interaktion von Sprouty 1 und der Mutante ΔNE1A_{13S} eine Bindung mit einer nur geringen Affinität nachweisen (vgl. Abb. 5).

A**B**

- Ernte nach 1 h Stimulierung mit bFGF
- Ernte nach 5 h Stimulierung mit bFGF
- Ernte nach 7 h Stimulierung mit bFGF
- Ernte nach 9 h Stimulierung mit bFGF

Abb. 17: Vergleichende SRE-Transaktivierungsstudien mit E1A_{13s} und der Deletionsmutante ΔNE1A_{13s}. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg des Luciferase Reportervektors pSRE-Luc und jeweils 0,5 µg der verschiedenen Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Durch entsprechende Zugabe des Leervektors wurde die Gesamt-DNA-Menge bei 2 µg konstant gehalten. 14 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert und nach einer Stimulierung mit 20 ng/ml bFGF für 1 bis 9 h (siehe die entsprechende farbliche Markierung) lysiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität bestimmt. Die relativen Enzymaktivitäten

entsprechen dem Mittelwert aus Doppelbestimmungen und sind hier repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Transfektionsexperimente dargestellt. Die Promotoraktivität der Reportersequenz des SRE in Anwesenheit des Leervektors pcR3.1 wurde als 1 normiert. Zur Expressionskontrolle der E1A_{13S}- und Sprouty 1-Proteine (mSpry1) in den Gesamtzellextrakten wurden Western Blot Analysen durchgeführt und die Proteine mittels eines anti-Ad12E1A-Antiserums und unter Anwendung des Antikörpers anti-Sprouty 1 detektiert (exemplarisch dargestellt). **(A)** Ergebnisse des Luciferase Reporter Assays mit dem Wildtyp Protein E1A_{13S}. **(B)** Ergebnisse des Luciferase Reporter Assays mit der Mutante Δ NE1A_{13S}.

Um die Auswirkungen dieser schwachen Bindung funktionell zu charakterisieren, wurden Luciferase Assays mit der Mutante Δ NE1A_{13S} und Sprouty 1 in HeLa-Zellen nach Stimulierung mit bFGF durchgeführt. Da in den Expressionsanalysen eine bis zu 8-fach induzierte SRE-Aktivierung durch Δ NE1A_{13S} detektiert werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass der Aminoterminus für die E1A-induzierte SRE-Aktivierung nicht essentiell ist. Im Vergleich zum E1A-Wildtyp-Protein führte die Koexpression von Sprouty 1 mit der Δ NE1A_{13S}-Mutante nicht zu einer Reduktion der Δ NE1A_{13S}-induzierten Genexpression (vgl. Abb. 17B). Nach 7 und 9 h konnte außerdem eine erhöhte Transaktivierung durch Δ NE1A_{13S} bei gleichzeitiger Expression von Sprouty 1 festgestellt werden. Da, wie ich zeigen konnte, das Δ NE1A_{13S}-Protein nur schwach mit Sprouty 1 interagiert, hätte man aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse auch eine Reduktion der Δ NE1A_{13S}-induzierten Transaktivierung des SREs durch Sprouty 1 erwartet. Das Sprouty 1 weiterhin die Basalaktivität reprimiert, dient als interne Kontrolle zum Nachweis der inhibitorischen Funktion von Sprouty 1. Mögliche Gründe für das hier gezeigte unerwartete Ergebnis werden in der Diskussion erörtert. Zum direkten Vergleich wurden transiente Expressionsanalysen mit dem Wildtyp-Protein E1A_{13S} und parallel dazu mit der Mutante Δ NE1A_{13S} in einem Ansatz durchgeführt und entsprechend ausgewertet. Hierbei konnte bestätigend zu den vorangegangenen Ergebnissen nach einer Inkubationsdauer von 7 h eine verringerte Inhibition durch Sprouty 1 bei Koexpression von Δ NE1A_{13S} festgestellt werden (siehe Abb. 18). Zwar ließ sich hier für den Wildtyp eine höhere SRE-Aktivierung als für die Deletionsmutante Δ NE1A_{13S} detektieren (5,6 für E1A_{13S} und 2,9 der relativen Luciferase Aktivität für Δ NE1A_{13S}), jedoch zeigten weitere Analysen z. T. vergleichbare SRE-Aktivierungen (Daten hier nicht aufgeführt). Zur Kontrolle der exprimierten Genprodukte wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Sprouty 1 zwar die Transaktivierung des SREs durch E1A_{13S}, jedoch nicht in Koexpression mit der Mutante Δ NE1A_{13S} inhibieren kann. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die Interaktion

über den N-Terminus von E1A_{13S} für die Funktion von Sprouty 1, inhibitorisch in den aktivierten FGFR-Signalweg eingreifen zu können, entscheidend ist. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die aminoterminal Mutante von E1A_{13S} nicht in der Lage ist die SRE-Aktivierung entsprechend dem Wildtypen zu stimulieren und sich somit eine Inhibition durch Sprouty 1 kaum detektieren lässt.

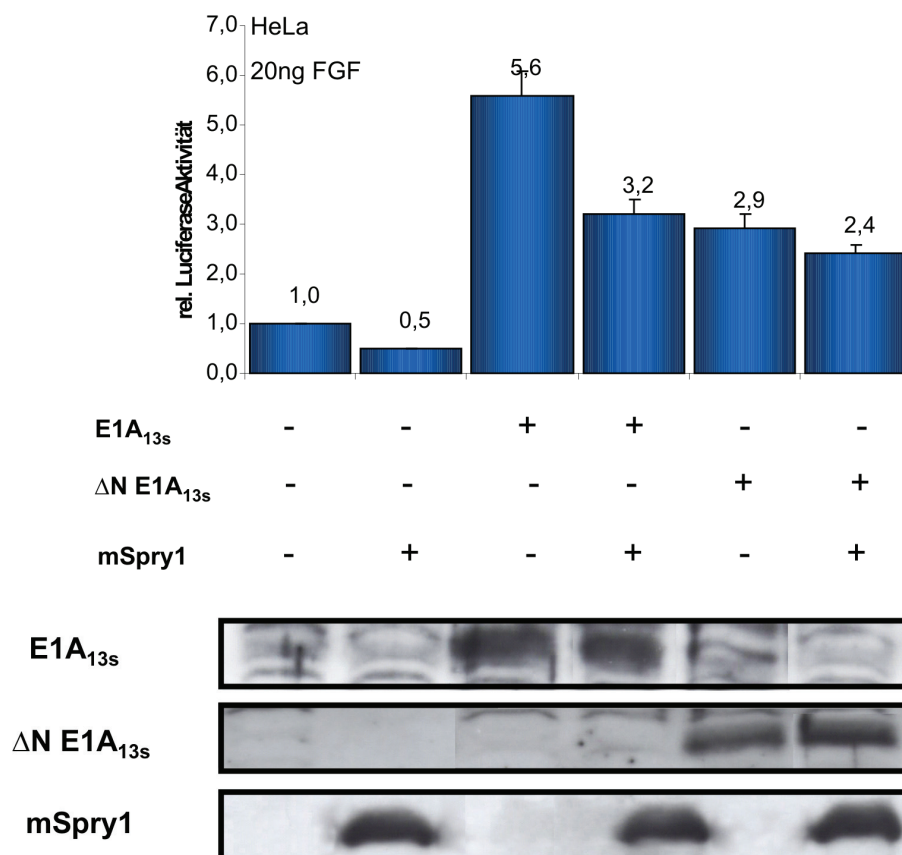


Abb. 18: Die Koexpression von Sprouty 1 und ΔNE1A_{13S} führt nicht zu der Inhibition der induzierten SRE-Aktivierung wie bei dem Wildtyp-Protein E1A_{13S}. Zur transienten Expressionsanalyse wurden HeLa-Zellen mit 1 µg des Luciferase Reportervektors pSRE-Luc und jeweils 0,5 µg der verschiedenen Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Durch entsprechende Zugabe des Leervektors wurde die Gesamt-DNA-Menge bei 2 µg konstant gehalten. 14 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5% Serum im DMEM-Medium) inkubiert und nach einer Stimulierung mit 20 ng/ ml bFGF für 7 h lysiert und die Luciferase-Enzymaktivität bestimmt. Die relativen Enzymaktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus Doppelbestimmungen und sind hier repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Transfektionsexperimente dargestellt. Die Promotoraktivität der Reportersequenz des SRE in Anwesenheit des Leervektors pcR3.1 wurde als 1 normiert. Zur Expressionskontrolle der E1A_{13S}- und mSpry1- Proteine in den Gesamtzellextrakten wurden Western Blot Analysen durchgeführt und die Proteine mittels eines anti-Ad12E1A-Antiserums und unter Anwendung des Antikörpers anti-Sprouty 1 detektiert.

4.5.3 Die Phosphorylierungen der MAP-Kinasen ERK1/2 (p42/p44) werden durch E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 und Sprouty 1 modifiziert

Die Luciferase Assays zeigen, dass die E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung des Responseelements SRE nach Stimulierung mit bFGF durch Sprouty 1 inhibiert wird. Die Aktivierung der FGF-Rezeptoren führt zur Phosphorylierung und somit Aktivierung des ERK- (extracellular-regulated kinases) Signalwegs. Innerhalb dieses Signalweges werden über Phosphorylierung einzelner Kinasen schließlich die MAP-Kinasen ERK1 (p44) und ERK2 (p42) aktiviert, welche in den Zellkern translozieren. Dort phosphorylieren sie diverse Transkriptionsfaktoren, die z.B. an die Promotorsequenz des *serum response element* (SRE) binden und diesen transkriptionell aktivieren. Zur weiteren Analyse, ob sich die Beeinträchtigung des FGFR-Signalweges auch in der Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinasen widerspiegelt, wurde die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen in transient transfizierten Zellen mittels spezifischer Antikörper untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsvektoren für das Sprouty 1- und das E1A_{13S}-Protein transient kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden parallel Transfektionsansätze durchgeführt, in denen entweder das Sprouty 1-Protein oder das E1A_{13S}-Protein allein exprimiert wurde. Anschließend wurden die transfizierten Zellen für 24 h in Serum-reduziertem-DMEM-Medium (statt 10 % FKS wurden dem Medium 0,5 % Serum zugesetzt) inkubiert. Zur Aktivierung des FGFR-Signalweges wurden die Zellen mit 20 ng/ ml bFGF im Medium stimuliert und nach 1 h und 2 h geerntet. Unter Anwendung spezifischer Antikörper, welche die Phosphorylierung der ERK-Kinasen am Threoninrest 202 und Tyrosinrest 204 detektieren, wurde mittels Immunoblot-Analysen die Aktivierung der ERK-Kinasen in dem Zellextrakt der transfizierten HeLa-Zellen analysiert. Hierbei wurden für eine vergleichende Analyse gleiche Proteinmengen untersucht.

Die Expression von E1A_{13S} und Sprouty 1 führte zu Phosphorylierungsänderungen der ERK1/2-Kinasen, welche die Transaktivierungsergebnisse des SRE widerspiegeln (siehe Abb. 19). Nach einer Inkubationszeit von 1h ließ sich eine verringerte Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen in Sprouty 1 exprimierenden HeLa-Zellen feststellen. Die Expression von E1A_{13S} zeigte dagegen eine erhöhte Phosphorylierung der Kinasen, welche mit einer erhöhten Aktivierung einhergeht. Die Koexpression von Sprouty 1 und E1A_{13S} führte dagegen zu

einer verringerten E1A_{13S}-induzierten Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Aktivierung der Responseelemente TRE und SRE.

Zur Analyse, ob die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen durch die Expression der Mutante Δ NE1A_{13S} beeinflusst wird, wurden transiente Kotransfektionsanalysen mit Sprouty 1 und der aminoterminalen Deletionsmutante von E1A_{13S} durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Koexpression von Δ NE1A_{13S} und Sprouty 1 nach einer Inkubationsdauer von 1 h mit bFGF zu einer höheren Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen führte als ohne die Expression von exogenem Sprouty 1 (siehe Abb. 19B), was die Ergebnisse der SRE-Aktivierung unterstützt (Abb. 17B). Die Untersuchungen der Zellextrakte nach einer Inkubationsdauer von 2 h ließen kaum einen Unterschied zwischen der ERK1/2-Phosphorylierung aus dem Kontrollansatz und dem nach Sprouty 1 Überexpression erkennen. Zwar war die E1A_{13S}-induzierte Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen in den entsprechend transfizierten Zellen detektierbar, jedoch ließ sich nur noch ein geringer Phosphorylierungsunterschied zu den E1A_{13S} und Sprouty 1 koexprimierenden Zellen feststellen. Ebenso zeigten die transienten Expressionsuntersuchungen mit Δ NE1A_{13S} nach 2 h keinen signifikanten Phosphorylierungsunterschied von ERK1/2 bei gleichzeitiger Anwesenheit von exogenem Sprouty 1. Zur weiteren Analyse wurden außerdem transfizierte HeLa-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 3 h mit bFGF untersucht. Hierbei ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der ERK1/2-Kinasen detektieren (Daten hier nicht aufgeführt). Dass sich der Phosphorylierungsunterschied der ERK1/2-Kinasen nicht auf unterschiedliche Proteinkonzentrationen zurückführen lässt, wurde durch die Immunoblot-Analyse mit dem anti-ERK1/2-Antikörper bestätigt. Zur Expressionskontrolle der durch die Transfektion entstehenden Genprodukte wurden die Gesamtzellextrakte mittels Western Blot und spezifischer Antikörper analysiert. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsstudien mit den ERK1/2-Kinasen korrelieren insbesondere nach einer Stimulierungsdauer von 1 h mit bFGF, mit den Ergebnissen aus den SRE-Transaktivierungsstudien. Dass nach 2 h bFGF-Stimulierung kaum noch ein Unterschied zwischen den ERK1/2-Kinasen detektierbar ist, lässt sich vermutlich auf die neu entstehenden Genprodukte zurückführen, welche die Aktivierung der ERK1/2-Kinasen mit beeinflussen können.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus dem Luciferase Assay, dass die Koexpression von E1A_{13S} und Sprouty 1 funktionelle Konsequenzen auf den FGFR-

Signalweg hat, die sich auch durch die beeinträchtigte Aktivierung der ERK1/2-Kinasen detektieren lässt, und sich von der Koexpression mit der Mutante Δ NE1A_{13S} deutlich unterscheiden.

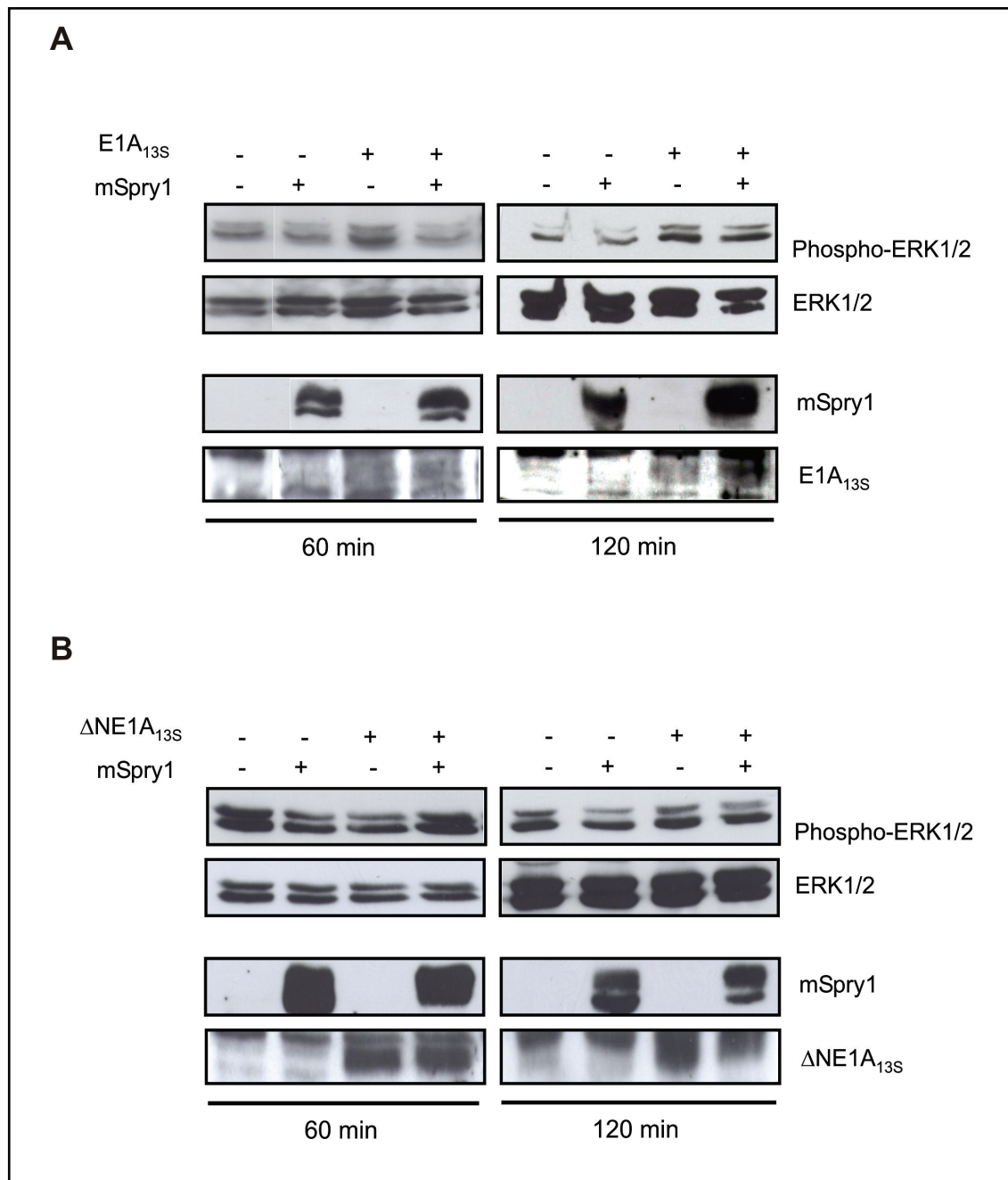


Abb. 19: Die Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinasen wird durch E1A_{13S} und Sprouty 1 beeinträchtigt. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für (A) Sprouty 1 (mSpry1) bzw. E1A_{13S} und (B) mSpry 1 bzw. Δ NE1A_{13S} transfiziert bzw. kotransfiziert. Die Menge an transfizierter Gesamt-DNA betrug 16 μ g für 2×10^6 Zellen und wurde in den Kontrollansätzen mit dem Leervektor entsprechend ausgeglichen. Die Zellen wurden 14 h nach der Transfektion für 24 h in Serum-reduziertem-Vollmedium (0,5 % Serum im DMEM-Vollmedium) inkubiert. Nach einer Stimulierung mit 20 ng/ ml bFGF für 1 bis 2 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte mittels Immunoblot-Analysen unter Anwendung der spezifischen Antikörper anti-Phospho-ERK1/2 (p44/42), anti-ERK1/2(p44/42), anti-Sprouty 1 und des Antiserums anti-Ad12E1A analysiert.

5. Diskussion

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie die Differenzierung, die Zellzykluskontrolle und die Apoptose werden durch adenovirale E1A-Proteine nach Infektion der Wirtszelle beeinflusst. Die Aufklärung der Wirkungsweisen von E1A-Proteinen trägt daher zu einem besseren Verständnis der molekularen Abläufe zellphysiologischen Prozessen und ihrer Regulation bei.

Die Funktionen der E1A-Genprodukte innerhalb des Zellkerns sind weitgehend analysiert worden, jedoch ist nur relativ wenig über die im Zytoplasma verbleibenden E1A-Proteine bekannt. Die Vermutung, dass die E1A-Proteine im Zytoplasma funktionell aktiv sind, wird durch die entdeckte Acetylierung am Lysinrest 239, die zum Verbleib der E1A-Proteine im Zytoplasma führt, gestützt (Mason *et al.*, 2002).

Zur Analyse einer zytoplasmatischen Funktion wurde in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe eines „SOS-Two-Hybrid-Systems“ nach zytoplasmatisch lokalisierten E1A-Interaktionspartnern gesucht. Hierbei wurde Sprouty 1, ein regulatorisches Protein des RTK-Signalweges, als E1A-Interaktionspartner identifiziert. Durch das Eingreifen in den RTK-Signalweg modulieren (reprimieren) die Sprouty-Proteine zellphysiologische Vorgänge, wie z.B. die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Eine funktionelle Folge der Interaktion von E1A-Proteinen mit Sprouty könnte daher die Deregulation solcher zellphysiologischer Prozesse zugunsten der Virusentwicklung sein. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese sollten Charakterisierungsstudien und funktionelle Analysen der Interaktion von Sprouty mit den adenoviralen E1A-Proteinen durchgeführt werden. Unter Anwendung molekularbiologischer und zellbiologischer Analysen konnte ich im Wesentlichen folgendes zeigen:

1. Adenovirale E1A-Proteine interagieren *in vitro* mit den Proteinen Sprouty 1, Sprouty 2 und Sprouty 3. Dabei weisen die *in vitro* Studien auf unterschiedliche Interaktionsaffinitäten der verschiedenen Sprouty-Proteine mit den E1A-Proteinen hin. Für die Interaktion mit den E1A-Proteinen ist die carboxyterminale Hälfte von Sprouty 1, in der sich die konservierte Sprouty-Domäne befindet, essentiell; für die Bindung zu Sprouty 1 sind der Aminoterminal und die CR3-Domäne der E1A-Proteine notwendig.
2. E1A_{12S} des Adenovirus-Serotyps 12 interagiert mit Sprouty 1 auch *in vivo*.

3. Das zytoplasmatisch lokalisierte E1A_{13S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 12 liegt mit Sprouty 1 assoziiert im Zytoplasma vor. Die Interaktion zu E1A_{13S} führt nicht zu einer Translokation von Sprouty 1 in den Zellkern.
4. Die durch E1A_{13S}- und cJun-induzierte Aktivierung des TPA *responsive element* (TRE) wird durch Sprouty 1 inhibiert.
5. Die Interaktion von E1A_{13S} und Sprouty 1 hat funktionelle Konsequenzen für den FGFR-Signalweg. Die E1A_{13S}-induzierte Aktivierung des *serum response element* (SRE) wird durch Sprouty 1 inhibiert, was mit einer modifizierten Phosphorylierung (Aktivierung) der ERK1/2-Kinasen einhergeht.

5.1 Interaktionsanalyse der adenoviralen E1A-Proteine mit den zellulären Sprouty-Proteinen

Über die Funktionen der im Zytoplasma verbleibenden E1A-Proteine und deren Interaktionspartnern war zu Beginn meiner Arbeit und ist noch heute nur relativ wenig bekannt. Auch sind z.B. die funktionellen Folgen aus der Interaktion der E1A-Proteine mit dem Protein Rack1 oder dem 26S Proteasom nur teilweise aufgeklärt (Sang *et al.*, 2001; Severino *et al.*, 2004; Turnell *et al.*, 2000). Für die Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit RII α der Protein Kinase A konnte dagegen eine E1A-vermittelte Translokation der Protein Kinase A in den Zellkern detektiert werden, die zu einer Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors führt (Fax *et al.*, 2001).

Zur Erfassung weiterer zytoplasmatischer Interaktionspartner von adenoviralen E1A-Proteinen wurde in unserer Arbeitsgruppe daher ein „SOS-Two-Hybrid-System“ etabliert und angewendet. Hierbei wurde neben der regulatorischen Untereinheit RII α der Protein Kinase A und dem r-SREC- („rat Small REC“) Protein (einem noch relativ unbekannten potentiellen Tumorsuppressor) auch Sprouty 1, ein regulatorisches Protein des RTK-Signalweges, als zytoplasmatischer E1A-Interaktionspartner identifiziert. Im Rahmen dieser „SOS-Two-Hybrid-System“-Interaktionsanalyse wurde auch das für das hoch-onkogene Adenovirus-Serotyp 12 spezifische E1A_{9,5S}-Protein, bei dem nur das aminoterminal Ende (die ersten 29 Aminosäuren) mit den übrigen E1A-Proteinen

übereinstimmt, als „Bait“ eingesetzt. Aus diesen Experimenten, bei denen auch carboxyterminale Mutanten des E1A_{9,5S}-Proteins eingesetzt wurden, konnte geschlossen werden, dass das aminoternale Ende der E1A-Proteine an der Interaktion mit Sprouty 1 beteiligt ist (Esche, unpubliziert).

Zur Bestätigung und weiteren Analyse dieser Interaktion wurden Protein-Protein-Interaktionsanalysen *in vitro* („GST-Pull-Down-Analysen“) und *in vivo* (Immunpräzipitationen) durchgeführt. Für die drei untersuchten Wildtyp-Proteine E1A_{13S}, E1A_{12S} und E1A_{9,5S} des Adenovirus-Serotyps 12 konnte eine Interaktion mit den Proteinen Sprouty 1 und Sprouty 4 festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass die Interaktionsanalysen *in vitro* durchgeführt und die eingesetzten Proteinmengen angeglichen wurden, ließen sich Affinitätsunterschiede für die Interaktionen mit den unterschiedlichen Sprouty-Proteinen ableiten. Für Sprouty 2 konnte eine starke Affinität zu E1A_{13S} und eine schwache Affinität zu E1A_{9,5S} detektiert werden. Dagegen konnte ich keine Interaktion für Sprouty 2 mit dem E1A_{12S}-Protein feststellen (siehe Abb. 5B). Für Sprouty 1 wurde exemplarisch die Interaktion mit dem E1A_{12S}-Protein auch *in vivo* bestätigt.

Da die aminoternale Aminosäuresequenz in allen E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 konserviert ist, wurden zur Analyse der interagierenden E1A-Domäne weitere „GST-Pull-down-Experimente“ mit einer Deletionsmutante des Wildtyp-Proteins E1A_{12S} durchgeführt, der das aminoternale Ende fehlt (Δ NE1A_{12S}). Hierbei ließ sich wie in dem „SOS-Two-Hybrid-System“ eine N-terminal-abhängige Interaktion zu Sprouty 1 feststellen (siehe Abb. 5). Für die Interaktion mit den bekannten zytoplasmatisch lokalisierten E1A-Interaktionspartnern, dem 26S Proteasom (über die S4- und S8-ATPasen) und der regulatorischen Untereinheit RII α der Protein Kinase A, konnte ebenfalls eine aminoterminal-abhängige Interaktion von E1A festgestellt werden (Turnell *et al.*, 2000; Fax *et al.*, 2001). Da sowohl das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein als auch die Deletionsmutante Δ NE1A_{12S} keine Interaktion zu Sprouty 2 zeigen, kann vermutet werden, dass die Interaktion von Sprouty 2 mit den Wildtyp-Proteinen E1A_{13S} und E1A_{9,5S} nicht vom N-Terminus abhängt. Sprouty 4 bindet unabhängig vom deletierten N-Terminus des E1A_{12S}-Proteins, zeigt jedoch eine stärkere Affinität zu den Proteinen E1A_{13S} und E1A_{12S} als zu dem E1A_{9,5S}-Protein und der Deletionsmutante Δ NE1A_{12S}. Die Affinitätsabweichungen lassen sich vermutlich auf Sequenzunterschiede der Sprouty-Proteine zurückführen und deuten auf individuelle

Interaktionsmechanismen (z.B. über unterschiedliche Phosphorylierungsbereiche oder in Abhängigkeit von involvierten Kofaktoren) zu den E1A-Proteinen hin.

Da sich außerdem eine schwache Bande aus der Interaktion mit der Mutante Δ NE1A_{13S} und Sprouty 1 detektieren ließ (siehe Abb. 5A), scheint die CR3-Domäne von E1A für eine schwache Bindung zu Sprouty 1 mitverantwortlich zu sein. Die CR3-Domäne wird aufgrund alternativer Spleißprozesse nur in der E1A_{13S}-Isoform exprimiert. Diese Domäne stellt ebenso wie der N-Terminus und die konservierten Domänen CR1, CR2 und CR4 Interaktionsbereiche zur Transkriptionsregulation dar. Sie fungiert als eigenständige, spezifische Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne (Jones, 1995; als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995).

Aufgrund der relativ vielen möglichen Interaktionspartner ist die Art und Weise, wie die Sprouty-Proteine auf die Zellphysiologie Einfluss nehmen, sehr komplex und variabel (als Übersicht siehe Mason *et al.*, 2006). Die Interaktionsanalyse der E1A-Proteine mit den Sprouty-Proteinen spiegelt diese Variabilität wider.

Die Interaktionsstudien mit Sprouty-Deletionsmutanten ermöglichten außerdem eine grobe Identifikation der für die Interaktion mit E1A-Proteinen verantwortlichen Domäne von Sprouty 1. Es zeigte sich, dass die carboxyterminale Hälfte von Sprouty 1 für die Interaktion zu den E1A-Proteinen notwendig ist (siehe Abb. 5A). Innerhalb dieser carboxyterminalen Hälfte der Sprouty-Proteine befindet sich die hoch konservierte Sprouty-Domäne, die für die regulatorische Funktion des Proteins essentiell ist (als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004). Dieser cysteinreiche konservierte Bereich ist sowohl für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen wie auch zur Homo- und Heterodimerisierung mit anderen Sprouty-Proteinen verantwortlich. Außerdem vermittelt es die Palmitoylierung von Sprouty an die Plasmamembran (Hanafusa *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2001; als Übersicht siehe Kim *et al.*, 2004).

Die Sprouty-Domäne konnte mittlerweile auch in weiteren Proteinfamilien identifiziert werden, unter anderem in den Spred-Proteinen. Ebenso wie die Sprouty-Proteine nimmt die Spred Proteinfamilie inhibitorisch Einfluss auf den RTK-Signalweg (Wakioka *et al.*, 2001). Unsere *in vitro* Interaktionsanalysen zeigten jedoch keine Bindung zwischen E1A-Proteinen des Adenovirus-Serotyps 12 und Spred 1 oder Spred 2. Dass sich keine Interaktion der E1A-Proteine mit den Spred-Proteinen feststellen ließ, könnte vielerlei Ursachen haben. Es ist z.B. nicht auszuschließen, dass benachbarte Aminosäuresequenzen der Sprouty-Domäne innerhalb der carboxyterminalen Hälfte von Sprouty 1 für die Interaktion mit E1A verantwortlich sind, welche in den Spred-

Proteinen nicht konserviert vorliegen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die Spred-Proteine zusätzlich die konservierte Interaktionsdomäne EVH1 und eine KIT-Bindungsdomäne aufweisen. Beide Proteindomänen sind für die inhibitorische Funktion der Spred-Proteine essentiell (Wakioka *et al.*, 2001). Die zusätzlichen Interaktionsdomänen könnten auf die Wechselwirkung mit den adenoviralen Proteinen Einfluss nehmen. Zur Aufklärung der Hintergründe einer fehlenden Interaktion zwischen den Spred- und E1A-Proteinen und zur detaillierten Analyse des Interaktionsmechanismus mit der Sprouty Proteinfamilie werden zurzeit durch Mutationsanalysen die für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuresequenzen untersucht.

Die Tatsache, dass eine Interaktion von Sprouty 1 auch mit dem E1A_{13S}-Protein des nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps 2 gefunden wurde, lässt die Schlussfolgerung zu, dass Sprouty 1 ein E1A-Interaktionspartner ist, der unabhängig vom Serotyp der Adenoviren bindet. Da die konservierte CR3-Domäne des hoch-onkogenen E1A_{13S}-Proteins für die Interaktion mit Sprouty 1 mitverantwortlich ist, war eine E1A-Interaktion über Serotypgrenzen hinaus zu vermuten. Die aminoterminalen Sequenz der E1A-Proteine (AS 1-29) weist zwar über Serotypgrenzen hinaus Homologien auf, jedoch zeigen sich hier zwischen hoch-onkogenen und nicht-onkogenen Adenovirus-Serotypen auch sequenzielle und funktionelle Unterschiede (Lipinski *et al.*, 1997). Aufgrund vergleichbarer Bandenintensitäten zwischen der Interaktion von Sprouty 1 mit dem E1A_{13S}-Protein des nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps 2 und dem analogen Experiment mit der Deletionsmutante Δ NE1A_{13S} des hoch-onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 (siehe Abb. 5), lässt sich vermuten, dass die CR3-Domäne, welche in allen Serotypen konserviert vorliegt, für die Interaktion des nicht-onkogenen E1A_{13S}-Proteins mit Sprouty 1 mitverantwortlich ist.

Die von uns erstmals nachgewiesene Interaktion von Sprouty 1 mit dem E7-Onkoprotein des humanen Papillomavirustyp 16 deutet darauf hin, dass Sprouty 1 auch ein wichtiges „Zielprotein“ für Onkoproteine anderer DNA-Tumoviren ist, um zellphysiologische Prozesse zu beeinflussen. (siehe Abb. 9). Ebenso wie die adenoviralen E1A-Proteine wirkt das E7-Protein des humanen Papillomavirustyps 16 transaktivierend auf virale und zelluläre Promotoren und ist vor allem im Zellkern lokalisiert. Da ich für E1A_{13S} eine zytoplasmatische Assoziation mit Sprouty 1 zeigen konnte, lässt sich für die Interaktion von E7 mit Sprouty 1 ebenfalls eine im Zytoplasma lokalisierte Interaktion vermuten. Das E7-Protein ist mitverantwortlich für das

transformierende Potential bestimmter Papillomavirustypen und interagiert außerdem mit vielen zellulären Proteinen, mit denen auch E1A-Proteine funktionell wechselwirken (Heck *et al.*, 1992; Jewers *et al.*, 1992; Dyson *et al.*, 1992). Zwischen dem E1A_{13S}-Proteinen und dem E7-Protein wurden Sequenzhomologien auf Proteinebene gefunden. Der Aminoterminus des E7-Proteins weist z.B. große Homologien zu den Domänen CR1 und CR2 des E1A-Proteins auf und vermittelt ebenso die Interaktion mit den Rb-Tumorsuppressorproteinen (Barbosa *et al.*, 1990; Chellapan *et al.*, 1992). Eine weitere strukturelle Homologie zwischen E1A und E7 findet sich innerhalb der carboxyterminalen Region des E7-Proteins; hier befindet sich ebenso wie in der CR3-Domäne des adenoviralen E1A_{13S}-Proteins eine Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne (Culp *et al.*, 1988; McIntyre *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1995). Da sich die CR3-Domäne des E1A-Proteins als Sprouty-Interaktionsdomäne identifizieren ließ, könnte die carboxyterminale Region des E7-Proteins ebenso für die Interaktion mit Sprouty 1 essentiell sein. In Immunfluoreszenzstudien ließ sich eine vorwiegende Lokalisation der E7-Proteine im Zellkern nachweisen (Greenfield *et al.*, 1991; Guccione *et al.*, 2002). Mögliche zelluläre Interaktionspartner der E7-Proteine, die im Zytoplasma lokalisiert sind, wurden bisher jedoch noch nicht untersucht. Sprouty 1 könnte somit der erste zytoplasmatisch lokalisierte Interaktionspartner von E7 des humanen Papillomavirustyp 16 sein. Die Interaktion von Sprouty 1 mit E7 könnte möglicherweise die gleichen funktionellen Folgen für die Zelle haben wie die Interaktion mit adenoviralen E1A-Proteinen.

5.2 Kolokalisationsnachweis von E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1

Lokalisationsstudien der E1A-Proteine in der Wirtszelle zeigen, dass zwar der größte Anteil an exprimierten E1A_{13S}-Proteinen im Zellkern lokalisiert ist, sich jedoch auch vereinzelt Anreicherungen im Zytoplasma finden lassen. Sprouty 1 ist in HeLa-Zellen hingegen über das gesamte Zytoplasma verteilt und nicht im Zellkern lokalisiert. Hierbei lassen sich Anreicherungen von Sprouty 1 in vesikelartigen Zellkompartimenten feststellen (siehe Abb. 10, 11 und 12). Impagnietello und Mitarbeiter konnten in HUVEC-Zellen (humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene) nach Stimulierung mit FGF2 eine Akkumulation von Sprouty 1 an der gesamten

Plasmamembran detektieren (Impagnietello *et al.*, 2001). Die Inkubationen mit bFGF in HeLa-Zellen ließen nur vereinzelt konzentrierte Sprouty 1-Ansammlungen an der Plasmamembran erkennen. Diese Akkumulationsunterschiede von Sprouty 1 an der Plasmamembran können vermutlich auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückgeführt werden, da die Funktionen der Sprouty-Proteine im Allgemeinen vom Zelltyp und den jeweils aktiven Interaktionspartnern abhängen.

In unseren Studien konnte eine Kolo-kalisation von E1A_{13S} und Sprouty 1 eindeutig im Zytoplasma nachgewiesen werden. Diese Assoziation lässt sich in vesikelartigen Zellkompartimenten detektieren, die über das gesamte Zytoplasma verteilt vorliegen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um frühe Endosomen handelt, denn die Aktivierung der FGF-Rezeptoren kann zu einer Translokation von Sprouty 1 an die Plasmamembran führen, wo das Protein über Palmitoylierung verankert wird. Hier assoziiert es z.B. mit Caveolin und beeinflusst die Aktivierung von Adaptormolekülen (Lim *et al.*, 2002; Impagnietello *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2001). Vermutlich interagiert Sprouty 1 hier auch mit E1A_{13S}-Proteine, die an der Plasmamembran verankert vorliegen, werden entweder durch Endozytose über frühe und späte Endosomen in den Lysosomen abgebaut oder zur Wiederverwertung über frühe Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert. Es kann daher spekuliert werden, dass sowohl die Sprouty-Proteine als auch die assoziierten E1A_{13S}-Proteine nach FGFR-Aktivierung endozytiert und in frühe Endosomen transportiert werden.

5.3 Die E1A_{13S}-Transaktivierung des TRE wird durch Sprouty 1 inhibiert

Das TPA *responsive element* (TRE) liegt in der Promotorsequenz einer Vielzahl von Genen vor. Diese kodieren unter anderem für Metalloproteinasen (z.B. Kollagenasen), Wachstumsfaktoren (z.B. NGF), Zellzyklusregulatoren (z.B. Zyklin D1) oder Transkriptionsfaktoren (z.B. Fra-1). Im *cjun*-Promotor befindet sich ebenfalls eine TRE-ähnliche DNA-Sequenz, an die bevorzugt cJun/ATF-Heterodimere oder ATF-Homodimere binden (Benbrook und Jones, 1990). Das cJun-Protein ist als Protoonkogen beschrieben worden und in die Regulation verschiedener zellulärer Funktionen wie der Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose

involviert (Szabo *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). Die Funktion von cJun ist abhängig von der zellulären Differenzierung. Eine E1A_{13S}-induzierte TRE-Aktivierung konnte bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden (Kitabayashi *et al.*, 1991; de Groot *et al.*, 1991). Die transaktivierende Wirkung auf das TRE-Responseelement durch E1A_{13S} konnte ich vor allem in Kotransfektionsstudien mit cJun bestätigen. Wie meine Ergebnisse zeigen, lässt sich eine sechsfache Aktivierung des TRE-Responseelements durch E1A_{13S} in Gegenwart von cJun in HeLa-Zellen induzieren (siehe Abb. 14). Die Überexpression von cJun erhöht die Anzahl an cJun/ATF2-Heterodimeren und cJun-Homodimeren, die als AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex an der TRE-Sequenz des *cJun*-Promotors binden und somit die induzierte Transkription durch E1A_{13S} vermitteln können. Auf diese Weise nimmt E1A_{13S} durch die Interaktion mit dem cJun/ATF2-Transkriptionsfaktorkomplex Einfluss auf die Genexpression verschiedener TRE-abhängiger Gene, die für die Zellzyklusregulation zur Einleitung der S-Phase und zur Transformation entscheidend sind. Ohne exogen zugeführtes cJun steigt die Aktivierung des TREs durch E1A_{13S} nur geringfügig an, was vermutlich auf endogene cJun-Proteine zurückgeführt werden kann.

Eine Inhibition der E1A_{13S}-induzierten TRE-Aktivierung durch Sprouty 1 konnte sowohl bei Kotransfektion mit cJun als auch in Abwesenheit von überexprimierten cJun-Proteinen gezeigt werden. Die Daten aus den Transfektionsexperimenten zeigen, dass Sprouty 1 die induzierte TRE-Aktivierung um mehr als ein Drittel reduzieren kann (siehe Abb. 14). Vermutlich interagiert Sprouty 1, wie schon zuvor beschrieben, im Zytoplasma mit bestimmten Proteinen des RTK-Signalweges (wie Grb2 oder Shp2), wodurch die Phosphorylierungskaskade des Signaltransduktionsweges inhibiert wird und somit bestimmte Transkriptionsfaktoren inaktiv bleiben und eine E1A_{13S}-induzierte Genexpression im Zellkern gehemmt wird.

Die Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 im Zytoplasma könnte zu einer Inaktivierung von Sprouty 1 führen, wodurch der RTK-Signalweg aktiv bleibt und somit die Transaktivierung durch E1A_{13S} über die Wechselwirkung mit aktiven Transkriptionsfaktoren ansteigt. Die Inhibition von Sprouty 1 würde somit die E1A-vermittelte Zellzykluseinleitung begünstigen. Die in unseren Studien detektierte Inhibition der TRE-Aktivierung durch Sprouty 1 könnte darauf zurückgeführt werden, dass aufgrund der Überexpression nur ein bestimmter Anteil von Sprouty 1 durch die im Zytoplasma verbleibenden E1A_{13S}-Proteine inaktiviert werden kann und somit aktiv verbleibende Sprouty 1-Proteine inhibitorisch in den RTK-Signalweg eingreifen.

Die hier vorliegenden Daten lassen jedoch auch eine weitere Hypothese der funktionellen Folge aus der zytoplasmatischen Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 zu: Die Interaktion mit E1A_{13S} könnte die Affinität von Sprouty 1 mit Proteinen des RTK-Signalweges (wie Adaptormolekülen) begünstigen, wodurch die Phosphorylierungskaskade des RTK-Signalweges inhibiert wird. Aufgrund fehlender aktiver Kofaktoren im Zellkern würde als Konsequenz eine Reduktion der E1A_{13S}-induzierten Transkription eintreten. Dies könnte als Folge eine „kontrollierte“ E1A_{13S}-induzierte Transaktivierung der Genexpression ermöglichen. In verschiedenen Zellen führt die Überfunktion von dem Onkoprotein Ras oder dem Transkriptionsfaktor Myc nicht zur Proliferation sondern zur Aktivierung von „Checkpoint Mechanismen“, die die Apoptose einleiten können (Evan *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2003). Eine Reduktion der E1A_{13S}-induzierten Transkription durch Sprouty 1 würde somit eine kontrollierte Zellzykluseinleitung begünstigen und eine mögliche Einleitung der Apoptose aufgrund einer unkontrollierten Aktivierung von Responseelementen (die z.B. zu einer Überexpression von Ras oder Myc führt) unterbinden. Zur weiteren Analyse wurden zusätzliche transiente Expressionsanalysen mit E1A_{13S} und Sprouty 1 im FGFR-Signalweg durchgeführt.

5.4 Die E1A_{13S}–induzierte Aktivierung des SRE über den FGFR-Signalweg wird durch Sprouty 1 inhibiert

In den Promotoren verschiedener Wachstumsfaktor-abhängiger Gene findet sich die DNA-Sequenz des *serum response element* (SRE) (siehe als Übersicht Treisman, 1990), das als Modell zum Studium der Transkriptionskontrolle durch Wachstumsfaktoren verwendet wird (Treisman, 1995). Die Aktivierung des SRE ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor *serum response factor* (SRF), welcher an die DNA-Sequenz bindet. Zur Aktivierung des *c-fos*-Promotors bildet z.B. das aktivierte SRF mit dem Transkriptionsfaktor ternary complex factor (TCF) einen Komplex zur Aktivierung der *c-fos* Transkription aus. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SRF und TCF kann durch eine Reihe von verschiedenen stimulierenden Faktoren wie UV-Licht, Wachstumsfaktoren, Hitze etc. über verschiedene Signalwege eingeleitet werden (als Übersicht siehe Cahill *et al.*, 1996).

Da für die HeLa-Zellen eine Integration der DNA-Sequenz des hochonkogenen humanen Papillomavirus Typ 18 (HPV18) sowie die Transkription der mRNAs der transformierenden frühen HPV-Proteine E6/E7 beschrieben wurde, wurden für die transienten Expressionsanalysen mit dem SRE-Reporterplasmid zusätzliche Studien mit der humanen epitheloiden Zervix-Karzinomzelllinie C33A und der Maus-Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 durchgeführt (Schwarz et al., 1985). In allen drei Zelllinien konnte ich eine Inhibierung der E1A_{13S}-induzierten SRE-Aktivierung durch Sprouty 1 nach Stimulierung mit FKS nachweisen und somit die Ergebnisse mit dem TRE-Responseelement bestätigen. Die Intensitäten der E1A_{13S}-induzierten Genexpression sowie der Inhibition durch Sprouty 1 zeigten in Abhängigkeit von der Zelllinie Unterschiede (siehe Abb. 16). Da die E1A-Proteine zur Modifikation der Genexpression von den in der Zelle vorhandenen zellulären Transkriptionsfaktoren abhängig sind und diese zelltypspezifisch variieren können, erklären sich die unterschiedlichen Intensitäten der E1A_{13S}-induzierten SRE-Aktivierung in den verschiedenen Zelllinien. Eine Inhibition der Basalaktivität durch Sprouty 1 konnte in C33A-Zellen nicht detektiert werden, in NIH-3T3-Zellen dagegen nur innerhalb einer Inkubationsdauer von 1 bis 5 h (siehe Abb. 16). Außerdem konnte ich in NIH-3T3-Zellen nach Kotransfektion von Sprouty 1 und E1A_{13S} innerhalb einer Inkubationsdauer von 1h eine höhere SRE-Aktivierung als in Einzeltransfektion mit E1A_{13S} detektieren. Diese Unterschiede der inhibitorischen Ausprägung von Sprouty 1 könnten ebenfalls durch die in den jeweiligen Zelllinien intrazellulär aktiven Proteinen begründet sein. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass eine Stimulierung mit 10 % FKS die Aktivierung vieler verschiedener Signalwege einleitet, die zusätzlich Einfluss auf die Funktion von Sprouty 1 und die SRE-Aktivierung nehmen können (siehe als Übersicht Cahill *et al.*, 1996 und Karin und Hunter, 1995).

Da ich eine Interaktion der E7-Onkoproteine mit den Sprouty 1-Proteinen zeigen konnte (siehe Abb. 9), wäre es möglich, dass die Expression der E7-Proteine in der HPV-positiven Zelllinie HeLa die Funktion der Sprouty 1-Proteine beeinflussen. Zum jetzigen Zeitpunkt fehlt mir jedoch eine genaue Expressionsanalyse der E7-Onkoproteine in den hier verwendeten HeLa-Zellen. Daher gehe ich zurzeit davon aus, dass aufgrund der Überexpression von E1A und Sprouty 1 nur ein vernachlässigbarer Einfluss von den E7-Proteinen auf die Funktion von Sprouty 1 bzw. die Interaktion von E1A mit Sprouty 1 ausgeübt wird.

Die Stimulierung mittels bFGF ermöglichte eine funktionelle Analyse von E1A_{13S} und Sprouty 1 innerhalb des gezielt aktivierten FGFR- (Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor) Signalweges. Hierbei konnte eine konstante Inhibition der Basalaktivität durch Sprouty 1 über die gesamte Inkubationsdauer von 9 h detektiert werden (siehe Abb. 17). In den Experimenten mit 10 % FKS ließ sich dagegen nur eine Reduktion der Basalaktivität durch Sprouty 1 nach 1h detektieren (siehe Abb. 15). Vermutlich beeinflussen parallel aktivierte Signalwege in den Experimenten mit 10 % FKS sowohl die Aktivierung der E1A_{13S}-induzierten Genexpression, als auch durch „Überkreuzungsinteraktionen“ die inhibitorische Funktion von Sprouty 1. Die E1A_{13S}-induzierte Aktivierung von SRE steigt mit der Zeit proportional an, was sich vermutlich auf die neu entstehenden Genprodukte durch die Transaktivierung über E1A_{13S} zurückführen lässt. Die SRE-Aktivierung durch E1A_{13S} könnte über die Interaktion mit dem TATA-Box-Bindungsprotein stattfinden, da Simon und Mitarbeiter für den *c-fos*-Promotor, welcher eine SRE-DNA-Sequenz aufweist, eine Transaktivierung durch E1A_{13S} in Abhängigkeit von der TATAA-Sequenz und dem TATA-Box-Bindungsprotein zeigen konnten (Simon *et al.*, 1990).

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, inhibiert Sprouty 1 in Kotransfektionsstudien die E1A_{13S}-induzierte SRE-Aktivierung um bis zu ca. 50% nach Stimulierung mit bFGF. Diese Daten zeigen erstmalig, dass die durch E1A_{13S}-induzierte Aktivierung des SREs in Abhängigkeit von „stimulierenden Agenzien“ des RTK-Signalweges (wie FKS oder bFGF) durch Sprouty 1 inhibiert wird. Die parallelen Ansätze mit der Mutante Δ NE1A_{13S} in HeLa-Zellen wiesen zwar eine induzierte SRE-Aktivierung auf, jedoch keine bzw. kaum eine Inhibition durch Sprouty 1 (siehe Abb. 17 und Abb. 18). Die *in vitro* Interaktionsanalysen mit der aminoterminalen Deletionsmutante von E1A_{13S} zeigten eine schwachaffine Interaktion mit Sprouty 1 (siehe Abb. 5). Aus diesem Grund lässt sich schlussfolgern, dass die unzureichende Interaktion zwischen Sprouty 1 und E1A_{13S} der Grund für die veränderte Aktivierung des SREs ist und somit die Vermutung einer funktionellen Interaktion im Zytoplasma gestützt wird.

Ebenso wie die Ergebnisse mit dem SRE-Responseelement zeigten die Daten aus den Phosphorylierungsuntersuchungen der ERK1/2-Kinasen deutlich, dass die Aktivierung des FGFR-Signalweges durch Sprouty 1 und E1A_{13S} beeinflusst wird (siehe Kap. 4.5.3). Die ERK1/2-Kinasen, welche die Aktivierung des FGFR-Signalweges in den Zellkern weiterleiten, wiesen eine erhöhte Aktivierung durch E1A_{13S} auf. Diese

wurden durch Sprouty 1 nachweislich reduziert (siehe Abb. 19). Aus den ERK1/2-Phosphorylierungsanalysen mit der E1A_{13S}-Deletionsmutante konnte insbesondere nach einer Inkubationsdauer von 1 h mit bFGF eine erhöhte Aktivierung der ERK1/2-Kinasen durch Δ NE1A_{13S} mit Sprouty 1 festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten der Luciferase Assays und stützen die Vermutung einer funktionellen Interaktion von Sprouty 1 mit E1A_{13S} im Zytoplasma.

Die Reduzierung der ERK1/2-Phosphorylierung durch Sprouty 1 konnte nur bis zu einer bFGF-Inkubationsdauer von 2 h detektiert werden. Vermutlich erreicht die Summe der aktivierten ERK1/2-Kinasen zu einem späteren Zeitpunkt die „Plateau-Phase“, wodurch kaum noch ein Unterschied feststellbar ist. Außerdem beeinflussen neu entstandene Genprodukte (wie z.B. weitere Kinasen und Phosphatasen) die intrazellulären Vorgänge und somit auch die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen. Der aus den Luciferase Assays detektierbare inhibitorische Einfluss auf die SRE-Aktivierung nach 2 h könnte neben der ERK1/2-Phosphorylierung auch auf das funktionelle Eingreifen weiterer Signalwege durch Sprouty 1 zurückgeführt werden. Die Aktivierung von RTK durch Wachstumsfaktoren kann z.B. neben der Aktivierung des MAPK-Signalweges auch zur Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges oder zur Phospholipase C γ Aktivierung führen (Marshall 1995).

Die hier aufgeführten Ergebnisse geben neue Einblicke in die Funktion der im Zytoplasma verbleibenden adenoviralen E1A-Proteine. Die Interaktion von E1A mit den Sprouty-Proteinen ermöglicht die Regulation des RTK-Signalweges und der damit verbundenen Genexpression. Durch Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte eindeutig bestätigt werden, dass der größte Anteil an exprimiertem E1A_{13S}-Proteinen im Zellkern lokalisiert ist (siehe Kap. 4.4). Hier interagieren die E1A-Proteine mit zellulären Transkriptionsfaktoren, um die Genexpression zu beeinflussen (siehe als Übersicht Gallimore und Turnell, 2001). Für das untersuchte E1A_{13S}-Protein konnte eindeutig eine transaktivierende Wirkung für die TRE- und die SRE-abhängige Genexpression gezeigt werden. Diese E1A_{13S}-induzierte Genexpression wird durch Sprouty 1 signifikant über mehrere Stunden inhibiert (siehe Kap. 4.5). Da für Sprouty 1 und E1A_{13S} eine physikalische Interaktion und zytoplasmatische Kolo-kalisation nachgewiesen wurde, könnte diese Assoziation zu einer Modifikation des RTK-Signalweges und der damit verbundenen Genexpression führen. Diese Vermutung wird insbesondere durch die Analysen mit der aminoterminalen Deletionsmutante gestützt. Sprouty 1 bindet

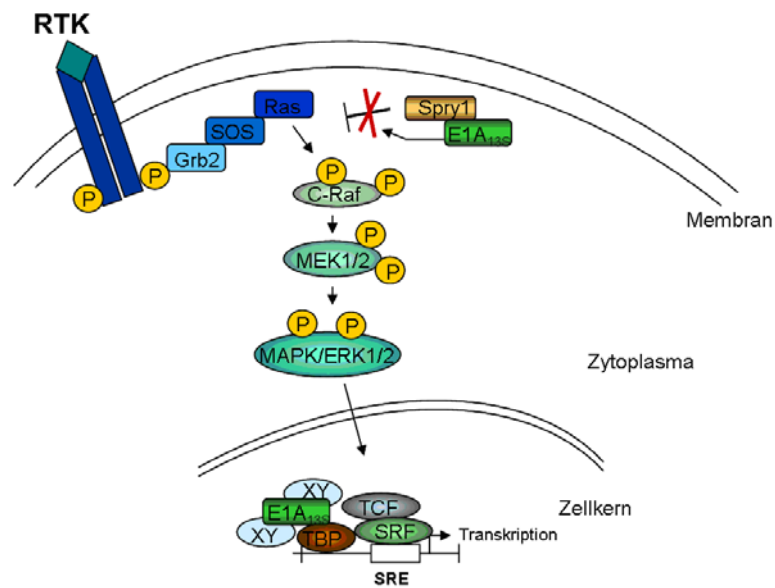
nachweislich nur mit einer geringen Affinität an Δ NE1A_{13S}, und Kotransfektionsstudien weisen keine (bzw. nur eine geringfügige) Inhibition der Δ NE1A_{13S}-induzierten Aktivierung durch Sprouty 1 auf. Zum Abschluss möchte ich aus den erarbeiteten Daten zwei mögliche Regulierungsmodelle ableiten, wie E1A_{13S} des Adenovirus-Serotyps 12 durch die Interaktion mit Sprouty 1 den RTK-Signalweg moduliert (siehe dazu Abb. 20):

1. Der aktivierte FGFR-Signalweg führt über die Aktivierung des Adaptormoleküls Grb2 zur Rekrutierung von SOS und zur Aktivierung der Phosphorylierungskaskade (über Ras, C-Raf, Mek1/2 und ERK1/2). Die Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 im Zytoplasma führt zu einer Inaktivierung von Sprouty 1. Als Konsequenz bleibt der RTK-Signaltransduktionsweg aktiv und somit steigt die Genexpression durch die im Zellkern lokalisierten E1A_{13S}-Proteine über die Wechselwirkungen mit aktivierten (phosphorylierten) Transkriptionsfaktoren und dem TATA-Box-Bindungsprotein an (siehe Abb. 20A). Die in unseren Studien detektierte Inhibition der TRE-, SRE- und ERK1/2-Aktivierung durch exogenes Sprouty 1 könnte darauf zurückgeführt werden, dass aufgrund der Überexpression von Sprouty 1 nur ein bestimmter Anteil der Sprouty-Proteine durch die im Zytoplasma verbleibenden E1A_{13S}-Proteine inaktiviert werden. Die aktiv verbleibenden Sprouty 1-Proteine könnten inhibitorisch in den RTK-Signalweg eingreifen. Die mangelnde Inhibition durch Sprouty 1 in Koexpression mit der Mutante Δ NE1A_{13S} könnte darauf zurückgeführt werden, dass die aminoterminal Mutante von E1A_{13S} nicht in der Lage ist, die SRE-Aktivierung entsprechend dem Wildtyp von E1A_{13S} zu stimulieren und sich somit eine Inhibition durch Sprouty 1 kaum auswirkt.
2. In dem zweiten möglichen Regulierungsmodell führt die zytoplasmatische Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 zu einer verstärkten Bindung mit bestimmten Proteinen des RTK-Signalweges (wie z.B. Adaptormolekülen). Hierdurch wird die Phosphorylierungskaskade des Signaltransduktionsweges inhibiert. Als Folge werden weniger Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert und somit die E1A_{13S}-induzierte Genexpression reduziert. Da sich die endogene Expression der Sprouty-Proteine über einen „negative feedback loop“ reguliert, würde auch eine regulierte Inhibition des RTK-Signalweges stattfinden. Die Reduktion der E1A_{13S}-induzierten Genexpression über Sprouty 1 könnte eine

„kontrollierte Transaktivierung der Genexpression“ zur Folge haben (siehe Abb. 20B). Eine kontrollierte Zellzykluseinleitung würde so begünstigt und eine mögliche Einleitung der Apoptose aufgrund einer Überaktivierung von Genprodukten wie Ras oder Myc unterbunden werden (Evan *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2003). Dieses Interaktionsmodell wird insbesondere durch die Ergebnisse mit der Deletionsmutante $\Delta\text{NE1A}_{13\text{S}}$ gestützt, die andeuten, dass eine vermutlich unzureichende Interaktion von $\text{E1A}_{13\text{S}}$ mit Sprouty 1 auch keine inhibitorische Wirkung auf die SRE-Aktivierung ermöglicht. Die mangelnde Inhibition durch Sprouty 1 in Koexpression mit der Mutante $\Delta\text{NE1A}_{13\text{S}}$ könnte jedoch auch darauf zurückgeführt werden, dass die schwache Wechselwirkung von $\Delta\text{NE1A}_{13\text{S}}$ mit Sprouty 1 ausschließlich über die CR3-Domäne erfolgt und sich daher eine Inaktivierung von Sprouty 1 ergibt. Wohingegen eine Interaktion mit dem Wildtyp von $\text{E1A}_{13\text{S}}$ vor allem über den N-Terminus erfolgt und als Konsequenz die inhibitorische Funktion von Sprouty 1 begünstigt wird.

Da der Aminoterminus eine wichtige Interaktionsdomäne von E1A darstellt, um sowohl transkriptionsregulierende Funktionen wie auch Wechselwirkungen mit zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen zu vermitteln, bleibt die Interpretation der Expressionsstudien mit dem $\Delta\text{NE1A}_{13\text{S}}$ -Protein schwierig. Eine Inaktivierung von Sprouty 1 durch $\text{E1A}_{13\text{S}}$, die zu einem aktiven Signaltransduktionsweg führt, scheint aufgrund der Notwendigkeit von aktivierten Transkriptionsfaktoren für die $\text{E1A}_{13\text{S}}$ -Transaktivierung am sinnvollsten. Eine mögliche Einleitung der Apoptose könnte stattdessen über die E1B-Proteine unterbunden werden, für die eine Inhibition der Apoptose bereits gezeigt werden konnte (als Übersicht siehe White, 1995). Ausgehend von meinen Ergebnissen soll zukünftig geklärt werden, welches dieser Interaktionsmodelle von $\text{E1A}_{13\text{S}}$ mit Sprouty 1 im Zytoplasma zutrifft. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um einen variablen Mechanismus handelt, der von den in der Zelle vorhandenen Kofaktoren abhängt. Zur Aufklärung soll überprüft werden, ob eine Modifikation der Phosphorylierung von Sprouty 1 in Gegenwart von $\text{E1A}_{13\text{S}}$ stattfindet. Des Weiteren soll über Protein-Protein-Interaktionsanalysen mit Proteinen des RTK-Signalweges (wie z.B. Grb2 oder Ras) der Regulierungsmechanismus über Sprouty 1 in dem hier vorliegenden zellulären Kontext analysiert werden. Die Aufklärung dieses Interaktionsmodells könnte neue Einblicke in die zellulären Regulationsprozesse des RTK-Signalweges ermöglichen.

A



B

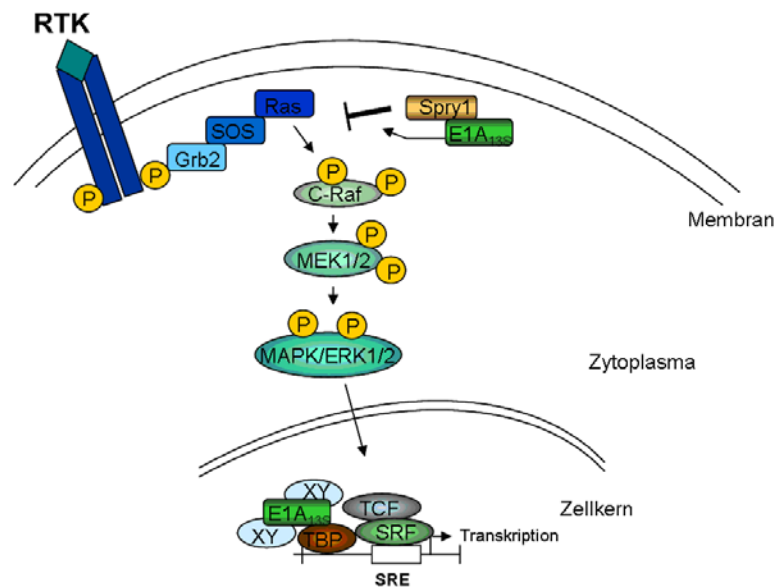


Abb. 20. Hypothetische Modelle zur Regulierung des RTK-Signalweges durch E1A_{13S} über die Interaktion mit Sprouty 1. Der aktivierte FGFR-Signalweg führt über die Aktivierung des Adaptormoleküls Grb2 zur Rekrutierung von SOS und zur Aktivierung der Phosphorylierungskaskade (über Ras, C-Raf, Mek1/2 und ERK1/2), wodurch die E1A_{13S}-induzierte Genexpression zusätzlich initiiert wird. Die zytoplasmatische Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 könnte entweder **(A)** zu einer Inaktivierung von Sprouty 1 führen, wodurch der RTK-Signalweg aktiv bleibt oder **(B)** zu einer Inhibition des RTK-Signalweges führen, wodurch eine „kontrollierte Transaktivierung der Genexpression“ möglich wäre (siehe Text). P= Phosphatgruppe; SRE= *serum response element*; SRF= *serum response factor*; TBP= TATA-Box-Bindungsprotein; TCF= ternary complex factor; XY= verschiedene Transkriptionsfaktoren, mit denen E1A_{13S} zur Transaktivierung interagiert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die adenoviralen E1A-Proteine greifen über spezifische Protein-Protein-Interaktionen in die Regulation zellulärer Prozesse ein. Die Identifikation und funktionelle Charakterisierung dieser zellulären Interaktionspartner von E1A tragen dazu bei, die Vorgänge zellulärer Mechanismen zur Regulation der Zellphysiologie aufzuklären. Da insbesondere über die Funktion der E1A-Proteine im Zytoplasma nur wenig bekannt ist, wurde in unserer Arbeitsgruppe gezielt nach zytoplasmatisch lokalisierten E1A-Interaktionsproteinen gesucht und dabei Sprouty 1 identifiziert. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, die Interaktion der E1A-Proteine des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1 zu bestätigen und genauer zu charakterisieren. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob und welche funktionellen Konsequenzen durch die Interaktion von Sprouty 1 mit E1A_{13S} auf den RTK-Signalweg entstehen.

In meiner Arbeit habe ich die Interaktion der E1A-Proteine mit Sprouty 1 bestätigen können. Des Weiteren konnte ich eine Interaktion zwischen den hoch-onkogenen E1A-Proteinen und Sprouty 2 sowie Sprouty 3 zeigen. Außerdem belegen die Interaktionsanalysen, dass Sprouty 1 sowohl mit dem nicht-onkogenen E1A_{13S}-Protein des Adenovirus-Serotyps 2 als auch mit dem E7-Onkoprotein des humanen Papillomavirustyp 16 interagiert. Die ersten Analysen mit Deletionsmutanten zeigen, dass die Interaktion zu Sprouty 1 über den Aminoterminus und die CR3-Domäne der E1A-Proteine vermittelt wird. Die carboxyterminale Hälfte von Sprouty 1, in der sich die konservierte Sprouty-Domäne befindet, ist nachweislich für die Interaktion mit den hoch-onkogenen E1A-Proteinen essentiell. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte ich eine Kolo-kalisation der E1A_{13S}-Proteine des Adenovirus-Serotyps 12 mit Sprouty 1 im Zytoplasma nachweisen.

Die funktionellen Analysen mit den Responseelementen TRE und SRE zeigen, dass die Koexpression des hoch-onkogenen E1A_{13S}-Proteins mit Sprouty 1 eine Reduktion der E1A_{13S}-induzierten Genexpression zur Folge hat. In den Analysen mit der aminoterminalen Deletionsmutante von E1A_{13S}, die nur mit einer geringen Affinität an Sprouty 1 bindet, konnte ich keine signifikante Inhibition der Δ E1A_{13S}-induzierten Genexpression und der ERK1/2-Kinasen-Phosphorylierung durch Sprouty 1 detektieren. Die Daten stützen die Vermutung einer funktionellen Interaktion von E1A_{13S} mit Sprouty 1 im Zytoplasma, jedoch bleibt gegenwärtig unklar, ob die Interaktion mit E1A_{13S} zu einer Inaktivierung von Sprouty 1 führt oder diese für die

Inhibition der E1A_{13S}-induzierten Genexpression verantwortlich ist, die eine „kontrollierte Transaktivierung der Genexpression“ ermöglicht.

Zur Aufklärung der intrazellulären Vorgänge, die über die Interaktion von Sprouty 1 und E1A_{13S} zur Modifikation der E1A_{13S}-induzierten Genexpression beitragen, soll zukünftig geklärt werden, ob und welche Proteine des Signaltransduktionsweges direkt beeinflusst werden. Über Protein-Protein-Interaktionsanalysen mit verschiedenen Adaptormolekülen, wie z.B. Grb2 oder SOS soll der Regulierungsmechanismus in dem hier vorliegenden zellulären Kontext analysiert werden. Zusätzlich ermöglichen zukünftige Interaktionsanalysen mit weiteren Sprouty-Mutanten die Identifikation der verantwortlichen Interaktionsregion zu E1A. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche die Interaktion der E1A Proteine mit den Sprouty-Proteinen begründen, und die daraus folgenden intrazellulären Modifikationen könnten neue Einblicke in die zellulären Regulationsprozesse liefern.

7. Literaturverzeichnis

Abe, M., and Naski, M. C. (2004): Regulation of sprouty expression by PLCgamma and calcium-dependent signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**: 1040-1047.

Angel, P. and Karin, M. (1991): The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.

Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1995): A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* **374**: 81-84.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., et al., eds. (1997): Current protocols in molecular biology. New York: Wiley.

Avvakumov, N., Wheeler, R., D'Halluin, J. C., and Mymryk, J. S. (2002): Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses. *J. Virol.* **76**: 7968-7975.

Bailey, A., and Mautner, V. (1994): Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* **205**: 438-452.

Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K. H. (1990): The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J.* **9**: 153-160.

Basson, M. A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T. J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G. R., Lufkin, T., McMahon, A. P., Wilson, P. D., Costantini, F. D., Mason, I. J., and Licht, J. D. (2005): Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev. Cell.* **8**: 229-239.

Bayley, S. T. and Mymryk, J. S. (1994): Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* **5**: 425-444.

Benko, M., Harrach, B., Both, G. W., et al., eds. (2005): Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *San Diego, California: Elsevier Academic Press.* p. 213-228

Benbrook, D. M., and Jones, N. C. (1990): Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**: 295-302.

Berk, A. J. (1986): Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 45-79.

Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1978): Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* **14**: 695-711.

- Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zijlstra, M., and Melief, C. J. (1983):** Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**: 776-779.
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brockmann, D., and Esche, H. (1995):** Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199** (Pt 3): 81-112.
- Brockmann, D., Fax, P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. and Esche, H. (2001):** Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295
- Brockmann, D., Feng, L., Kroner, G., Tries, B., and Esche, H. (1994):** Adenovirus type 12 early region 1A expresses a 52R protein repressing the trans-activating activity of transcription factor c-Jun/AP-1. *Virology* **198**: 717-723.
- Brockmann, D., Schafer, D., Kirch, H. C., and Esche, H. (1996):** Repression of c-Jun-induced mouse major histocompatibility class I promoter (H-2Kb) activity by the Adenovirus type 12-unique 52R E1A protein. *Oncogene* **12**: 1715-1725.
- Broker, T. R., Keller, C. C. and Roberts, R. J. (1984):** Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps*, Vol. 3 (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.
- Burgert, H. G., Maryanaska, J. L. and Kvist, S. (1987):** „E3/19K“ protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytotoxic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1356-1360.
- Byrd, P. J., Grand, R. J., and Gallimore, P. H. (1988):** Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. *Oncogene* **2**: 477-484.
- Cahill, M. A., Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996):** Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.* **6**: 16-19.
- Chambers, D., and Mason, I. (2000):** Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mech. Dev.* **91**: 361-364.
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., and Nevins, J. R. (1992):** Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 4549-4553.

- Choi, H., Cho, S. Y., Schwartz, R. H., and Choi, K. (2006):** Dual effects of Sprouty1 on TCR signaling depending on the differentiation state of the T cell. *J. Immunol.* **176**: 6034-6045.
- Cox, A. D., and Channing J. D (2003):** The dark side of ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8999-9006.
- Culp, J. S., Webster, L. C., Friedman, D. J., Smith, C. L., Huang, W. J., Wu, F. Y., Rosenberg, M., and Ricciardi, R. P. (1988):** The 289-amino acid E1A protein of adenovirus binds zinc in a region that is important for trans-activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**: 6450-6454.
- de Groot, R., Foulkes, N., Mulder, M., Kruijer, W., and Sassone-Corsi, P. (1991):** Positive regulation of jun/AP-1 by E1A. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 192-201.
- Debbas, M., and White, E. (1993):** Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**: 546-554.
- Doerfler, W. (1969):** Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.
- Duyndam, M. C., van Dam, H., van der Eb, A. J., and Zantema, A. (1996):** The CR1 and CR3 domains of the adenovirus type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2. *J. Virol.* **70**: 5852-5859.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K., and Harlow, E. (1992):** Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* **66**: 6893-6902.
- Esche, H., Schilling, R. and Doerfler, W. (1979):** In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J. Virol.* **30**: 21-31.
- Esche, H. and Siegmann, B. (1982):** Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells. *J. Virol.* **60**: 99-113.
- Evan, G., Wyllie, A., Gilbert, C., Littlewood, T., Land, H., Brooks, M., Waters, C., Penn, L., and Hancock, D. (1992):** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* **63**: 119-125.
- Fax, P., Carlson, C. R., Collas, P., Tasken, K., Esche, H. and Brockmann, D. (2001):** Binding of PKA-RIIalpha to the Adenovirus E1A12S oncoprotein correlates with its nuclear translocation and an increase in PKA-dependent promoter activity. *Virology* **285**: 30-41.
- Ferguson, B., Kripple, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H. and Rosenberg, M. (1985):** E1A13S and 12S mRNA products made in Eschericia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661

- Flint, J. and Broker, T. R. (1981):** Lytic infection by adenoviruses. *Molecular Biology of Tumor Viruses* (TOOZE, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp.443-547
- Fong, C. W., Chua, M. S., McKie, A. B., Ling, S. H., Mason, V., Li, R., Yusoff, P., Lo, T. L., Leung, H. Y., So, S. K., and Guy, G. R. (2006):** Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **66**: 2048-2058.
- Fong, C. W., Leong, H. F., Wong, E. S., Lim, J., Yusoff, P., and Guy, G. R. (2003):** Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *J. Biol. Chem.* **278**: 33456-33464.
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2001):** The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**: 297-307.
- Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T., and Dobner, T. (1998):** E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.
- Gallimore, P. H., and Turnell, A. S. (2001):** Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**: 7824-7835.
- Gariglio, P., Liopis, R., Oudet, P. and Chambon P. (1979):** The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a minichromosome. *J. Mol. Biol.* **131**: 75-105.
- Gey, G., Coffman, W. and Kubicek, M. T. (1952):** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer. Res.* **12**: 264-265
- Gooding, L. R., Elmore, L. W., Tollefson, A. E., Brady, H. A., and Wold, W. S. (1988):** A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**: 341-346.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993):** Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**: 477-486.
- Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., and Stanley, M. (1991):** Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11217-11221.
- Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J. D. (2001):** Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J. Biol. Chem.* **276**: 46460-46468.
- Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z. X., Kumar, S., Howley, P. M., and Livingston, D. M. (1998):** p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol. Cell.* **2**: 405-415.

- Guccione, E., Massimi, P., Bernat, A., and Banks, L. (2002):** Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology* **293**: 20-25.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M. A. (1998):** sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* **92**: 253-263.
- Hall, A. B., Jura, N., DaSilva, J., Jang, Y. J., Gong, D., and Bar-Sagi, D. (2003):** hSpry2 is targeted to the ubiquitin-dependent proteasome pathway by c-Cbl. *Curr. Biol.* **13**: 308-314.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., and White, E. (1996):** The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* **10**: 461-477.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002):** Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat. Cell. Biol.* **4**: 850-858.
- Harper, J. W., Burton, J. L., and Solomon, M. J. (2002):** The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev.* **16**: 2179-2206.
- Heck, D. V., Yee, C. L., Howley, P. M., and Munger, K. (1992):** Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 4442-4446.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., and Nicola, N. A. (1998):** Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 114-119.
- Horwitz, M. S. (1990):** Adenovirus. In: *Virology* (Fields, B. N. & Knipe, D. M., eds.), Raven Press, New York, pp. 1723-1740
- Impagnatiello, M. A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M., and Christofori, G. (2001):** Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **152**: 1087-1098.
- Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J., and Shenk, T. (1991):** Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J. Virol.* **65**: 3192-3202.
- Javier, R., and Shenk, T. (1996):** Mammary tumors induced by human adenovirus type 9: a role for the viral early region 4 gene. *Breast Cancer Res. Treat.* **39**: 57-67.
- Javier, R. T. (1994):** Adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a transforming protein required for the production of mammary tumors in rats. *J. Virol.* **68**: 3917-3924.

- Jelinek, T., Pereira, D. S., and Graham, F. L. (1994):** Tumorigenicity of adenovirus-transformed rodent cells is influenced by at least two regions of adenovirus type 12 early region 1A. *J. Virol.* **68**: 888-896.
- Jewers, R. J., Hildebrandt, P., Ludlow, J. W., Kell, B., and McCance, D. J. (1992):** Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J. Virol.* **66**: 1329-1335.
- Jones, N. (1995):** Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 59-80
- Karin, M., and Hunter, T. (1995):** Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5**: 747-757.
- Kim, H. J., and Bar-Sagi, D. (2004):** Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 441-450.
- Kimelman, D., Miller, J. S., Porter, D., and Roberts, B. E. (1985):** E1a regions of the human adenoviruses and of the highly oncogenic simian adenovirus 7 are closely related. *J. Virol.* **53**: 399-409.
- Kitabayashi, I., Chiu, R., Gachelin, G., and Yokoyama, K. (1991):** E1A dependent up-regulation of c-jun/AP-1 activity. *Nucleic. Acids. Res.* **19**: 649-655.
- Kwabi-Addo, B., Wang, J., Erdem, H., Vaid, A., Castro, P., Ayala, G., and Ittmann, M. (2004):** The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res.* **64**: 4728-4735.
- Laemmli, U. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophag T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lee, C. C., Putnam, A. J., Miranti, C. K., Gustafson, M., Wang, L. M., Vande Woude, G. F., and Gao, C. F. (2004):** Overexpression of sprouty 2 inhibits HGF/SF-mediated cell growth, invasion, migration, and cytokinesis. *Oncogene.* **23**: 5193-5202.
- Li, Y., Graham, C., Lacy, S., Duncan, A. M., and Whyte, P. (1993):** The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes Dev.* **7**: 2366-2377.
- Lim, J., Yusoff, P., Wong, E. S., Chandramouli, S., Lao, D. H., Fong, C. W., and Guy, G. R. (2002):** The cysteine-rich sprouty translocation domain targets mitogen-activated protein kinase inhibitory proteins to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in plasma membranes. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7953-7966.
- Lipinski, K. S., Kroner-Lux, G., Esche, H., and Brockmann, D. (1997):** The E1A N terminus (aa 1-29) of the highly oncogenic adenovirus type 12 harbours a trans-activation function not detectable in the non-oncogenic serotype 2. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 2)**: 413-421.

- Liu, F., and Green, M. R. (1990):** A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Cell* **61**: 1217-1224.
- Lo, T. L., Fong, C. W., Yusoff, P., McKie, A. B., Chua, M. S., Leung, H. Y., and Guy, G. R. (2006):** Sprouty and cancer: the first terms report. *Cancer Lett.* **242**: 141-150.
- Lo, T. L., Yusoff, P., Fong, C. W., Guo, K., McCaw, B. J., Phillips, W. A., Yang, H., Wong, E. S., Leong, H. F., Zeng, Q., Putti, T. C., and Guy, G. R. (2004):** The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res.* **64**: 6127-6136.
- Lyons, R. H., Ferguson, B. Q., and Rosenberg, M. (1987):** Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2451-2456.
- Madison, D. L., Yaciuk, P., Kwok, R. P., and Lundblad, J. R. (2002):** Acetylation of the adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin- α . *J. Biol. Chem.* **277**: 38755-38763.
- Marshall, C. J. (1995):** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.
- Mason, J. M., Morrison, D. J., Bassit, B., Dimri, M., Band, H., Licht, J. D., and Gross, I. (2004):** Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 2176-2188.
- Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A., and Licht, J. D. (2006):** Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell. Biol.* **16**: 45-54.
- Masters, S. L., Palmer, K. R., Stevenson, W. S., Metcalf, D., Viney, E. M., Sprigg, N. S., Alexander, W. S., Nicola, N. A., and Nicholson, S. E. (2005):** Genetic deletion of murine SPRY domain-containing SOCS box protein 2 (SSB-2) results in very mild thrombocytopenia. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 5639-5647.
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1993):** Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* **67**: 3142-3150.
- McKie, A. B., Douglas, D. A., Olijslagers, S., Graham, J., Omar, M. M., Heer, R., Gnanapragasam, V. J., Robson, C. N., and Leung, H. Y. (2005):** Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. *Oncogene* **24**: 2166-2174.
- Minowada, G., Jarvis, L. A., Chi, C. L., Neubuser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M. A., and Martin, G. R. (1999):** Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* **126**: 4465-4475.

- Moore, M., Horikoshi, N., and Shenk, T. (1996):** Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 11295-11301.
- Moran, E. (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.* **5**: 327-340.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mymryk, J. S., and Smith, M. M. (1997):** Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem. Cell. Biol.* **75**: 95-102.
- Nevels, M., Tauber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T. (1999):** Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* **73**: 1591-1600.
- Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H. D., Grutter, C., Grutter, M., and Tschopp, J. (2007):** The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell. Death. Differ.* **14**: 1457-1466.
- Pastan, I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987):** Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins, A. and Oldstone M. B. A., eds.), Springer Verlag, New York, pp. 141-146
- Peters, J. M. (2002):** The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell.* **9**: 931-943.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J., and Shenk, T. (1986):** The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 470-476.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., and Ward, T. G. (1953):** Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**: 570-573.
- Rubenwolf, S., Schutt, H., Nevels, M., Wolf, H., and Dobner, T. (1997):** Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J. Virol.* **71**: 1115-1123.
- Rubin, C., Litvak, V., Medvedovsky, H., Zwang, Y., Lev, S., and Yarden, Y. (2003):** Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr. Biol.* **13**: 297-307.
- Rubin, C., Zwang, Y., Vaisman, N., Ron, D., and Yarden, Y. (2005):** Phosphorylation of carboxyl-terminal tyrosines modulates the specificity of Sprouty-2 inhibition of different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **280**: 9735-9744.
- Rux, J. J., and Burnett, R. M. (2004):** Adenovirus structure. *Hum. Gene. Ther.* **15**: 1167-1176.

- Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L., and White, E. (1995):** Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1060-1070.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Sang, N., Severino, A., Russo, P., Baldi, A., Giordano, A., Mileo, A. M., Paggi, M. G., and De Luca, A. (2001):** RACK1 interacts with E1A and rescues E1A-induced yeast growth inhibition and mammalian cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**: 27026-27033.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003):** Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat. Cell. Biol.* **5**: 427-432.
- Sawada, Y. and Fujinaga, K. (1980):** Mapping of adenovirus type 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **36**: 639-651.
- Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (2006):** Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination. *Cancer Res.* **66**: 10229-10232.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985):** Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-114.
- Severino, A., Baldi, A., Cottone, G., Han, M., Sang, N., Giordano, A., Mileo, A. M., Paggi, M. G., and De Luca, A. (2004):** RACK1 is a functional target of the E1A oncoprotein. *J. Cell. Physiol.* **199**: 134-139.
- Shao, J., Sheng, H., DuBois, R. N., and Beauchamp D. (2000):** Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with increased ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation. *J. Biol. Chem.* **275**: 22916-22924.
- Shaw, A. T., Meissner, A., Dowdle, J. A., Crowley, D., Magendantz, M., Ouyang, C., Parisi, T., Rajagopal, J., Blank, L. J., Bronson, R. T., Stone, J. R., Tuveson, D. A., Jaenisch, R., and Jacks, T. (2007):** Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev.* **21**: 694-707.
- Shenk, T. (1996):** Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- Shim, K., Minowada, G., Coling, D. E., and Martin, G. R. (2005):** Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Dev. Cell.* **8**: 553-564.

- Sieber, T., and Dobner, T. (2007):** Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription. *J. Virol.* **81**: 95-105.
- Simon, M. C., Rooney, R. J., Fisch, T. M., Heintz, N., and Nevins, J. R. (1990):** E1A-dependent trans-activation of the c-fos promoter requires the TATAA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 513-517.
- Slansky, J. E., and Farnham, P. J. (1996):** Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 1-30.
- Stevens, J. L., Cantin, G. T., Wang, G., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Berk, A. J. (2002):** Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science.* **296**: 755-758.
- Sundararajan, R., and White, E. (2001):** E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *J. Virol.* **75**: 7506-7516.
- Sussenbach, J. S. and van der Vliet, P. C. (1983):** The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.
- Szabo, E., Riffe, M. E., Steinberg, S. M., Birrer, M. J., and Linnoila, R. I. (1996):** Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* **56**: 305-315.
- Tauber, B., and Dobner, T. (2001):** Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene.* **20**: 7847-7854.
- Telling, G. C., and Williams, J. (1994):** Constructing chimeric type 12/type 5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12. *J. Virol.* **68**: 877-887.
- Thomas, A., and White, E. (1998):** Suppression of the p300-dependent mdm2 negative-feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev.* **12**: 1975-1985.
- Thomas, D. L., Shin, S., Jiang, B. H., Vogel, H., Ross, M. A., Kaplitt, M., Shenk, T. E., and Javier, R. T. (1999):** Early region 1 transforming functions are dispensable for mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J. Virol.* **73**: 3071-3079.
- Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W. and Wold, W. S. M. (1996):** The E3-11,6-kDa adenovirus death protein is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* **200**: 152-162.
- Treisman, R. (1990):** The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin. Cancer Biol.* **1**: 47-58.
- Treisman, R. (1995):** Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *Embo J.* **14**: 4905-4913.

- Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P., and Greber, U. F. (2001):** Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 1092-1100.
- Turnell, A. S., Grand, R. J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S., and Gallimore, P. H. (2000):** Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J.* **19**: 4759-4773.
- Turnell, A. S., and Mymryk, J. S. (2006):** Roles for the coactivators CBP and p300 and the APC/C E3 ubiquitin ligase in E1A-dependent cell transformation. *Br. J. Cancer.* **95**: 555-560.
- Turnell, A. S., Stewart, G. S., Grand, R. J., Rookes, S. M., Martin, A., Yamano, H., Elledge, S. J., and Gallimore, P. H. (2005):** The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature* **438**: 690-695.
- van den Elsen, P. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983):** Morphological transformation of human adenovirus is determined to a large extent by gene products of region E1A. *Virology* **131**: 242-246.
- van der Eb, A. J. and Bernards, R. (1984):** Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.
- van der Eb, A. J., Mulder, C., Graham, F. L. and Houweling, A. (1977):** Transformation with specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene* **2**: 115-132.
- Van de Graaf, S. F. J., van der Kemp A. W. C. N., van den Berg D., van Oorschot M., Hoenderop j. G. J. and Bindels R. J. M. (2006):** Identification of BSPRY as a novel auxiliary protein inhibiting TRPV5 activity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**:26-30.
- Vasavada, R., Eager, K. B., Barbanti-Brodano, G., Caputo, A., and Ricciardi, R. P. (1986):** Adenovirus type 12 early region 1A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**: 5257-5261.
- Wadell, G. (1984):** Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001):** Sprouty is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* **412**: 647-651.
- Wang, J., Thompson, B., Ren, C., Ittmann, M., and Kwabi-Addo, B. (2006):** Sprouty4, a suppressor of tumor cell motility, is down regulated by DNA methylation in human prostate cancer. *Prostate* **66**: 613-624.
- Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. and Weitner, A. (1987):** *Molecular biology of the gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Melo Park, California, USA.

- White, E. (1995):** Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.
- White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W. S. M., Kushner, D. I. and Gooding, L. (1992):** The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2570-2580.
- Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., and Harlow, E. (1988):** Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**: 124-129.
- Williams, J., Williams, M., Liu, C. und Telling, G. (1995):** Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 149-177.
- Wu, X., Alexander, P. B., He, Y., Kikkawa, M., Vogel, P. D., and McKnight, S. L. (2005):** Mammalian sprouty proteins assemble into large monodisperse particles having the properties of intracellular nanobatteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 14058-14062.
- Yigzaw, Y., Poppleton, H. M., Sreejayan, N., Hassid, A., and Patel, T. B. (2003):** Protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) mediates the anti-migratory actions of Sprouty. *J. Biol. Chem.* **278**: 284-288.
- Zhang, H. S., und Dean, D. C. (2001):** Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 3134-3138.
- Zhang, H. S., Mak, S. and Branton, P. E: (1995):** Adenovirus type 12 early region 1 B proteins and metabolism of viral mRNAs. *Virology* **191**: 793-802.
- Zhang, Y., Bergelson J. M. (2005):** Adenovirus Receptors. *J. Virology* **19**: 12125-31
- Zhao, B., and Ricciardi, R. P. (2006):** E1A is the component of the MHC class I enhancer complex that mediates HDAC chromatin repression in adenovirus-12 tumorigenic cells. *Virology*. **352**: 338-344.
- Zhou, F., and Thompson, E. B. (1996):** Role of c-jun induction in the glucocorticoid-evoked apoptotic pathway in human leukemic lymphoblasts. *Mol. Endocrinol.* **10**: 306-316.

8. Publikationen

Zaremba, A. und Esche, H. (2006): Adenovirus E1A proteins interact with Sprouty, a regulatory protein of the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) signaling pathway. *Posterpräsentationen, FEBS Special Meeting Molecular Signaling – Dubrovnik 2006, The 8th International Adenovirus Meeting Zürich*

Zaremba, A., Schmücker, U. und Esche, H. (2007): Adenoviral E1A oncoproteins interact with Sprouty which leads to the modulation of the receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathway. *Posterpräsentation, Cold Spring Harbor Meeting on Phosphorylation, Signaling and Disease*

Hashemi R., Zaremba A., Brockmann D. und Esche H. (2007): Functional interaction between BRG1 and the adenoviral E1A oncoprotein in the process of CREB-dependent promotor activation. *Zur Publikation eingereicht*

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angelika Zaremba
Geburtsdatum: 15.12.1979
Geburtsort: Bottrop
Familienstand: ledig
Anschrift: Dieselstr. 1, 46238 Bottrop

Schul Ausbildung

1986-1990 Grundschole in Bottrop
1990-1996 Gustav-Heinemann-Realschole, Bottrop
Abschluss: Fachoberschulreife
1996-1999 Gymnasiale Oberstufe an der Berufs-, Berufsfach- und Fachoberschule Bottrop
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

September 1999-Juni 2004 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellmorphologie und molekulare Neurobiologie zum Thema
„Expressionsmuster von Protein-Tyrosinphosphatasen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Colliculus superior der Maus“
Abschluss: Diplom-Biologin
seit September 2004 Wissenschaftliche Angestellte und Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung), Universität Essen-Duisburg

Essen, den 27.11.2007

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema: **„Nachweis und Analyse der Interaktion von Sprouty-Proteinen mit adenoviralen E1A-Onkoproteinen“** zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Angelika Zaremba befürworte.

Essen, den _____
(Prof. Dr. H. Esche)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
(Angelika Zaremba)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
(Angelika Zaremba)

Danksagung

Sehr danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Esche für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Im Weiteren möchte ich ihm für seine engagierte Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft während meiner Promotionszeit danken.

Besonders danken möchte ich außerdem Frau Ursula Schmücker und Frau Claudine Kühn für die herzliche Art, die zu einem besonders netten Arbeitsklima beitrug. Des Weiteren möchte ich mich bei beiden für die hervorragende technische Mithilfe bei der Durchführung meiner Experimente bedanken.

Frau Dipl.-Biol. Antje Repenning möchte ich für die freundschaftliche Unterstützung während der Höhen und Tiefen des Laboralltags und zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Kerstin Lowinski und Bärbel Pöllmeier für ihre freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gulbins für die gelegentliche Nutzung einiger Geräte sowie der angenehmen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Dank gilt auch den in meiner Arbeit erwähnten Wissenschaftlern für die problemlose Bereitstellung verschiedener Plasmide, die für eine erfolgreiche Durchführung meiner Experimente entscheidend waren.

Sehr herzlich danken möchte ich meiner Schwester Monika Zaremba, für ihre Bemühungen meine Arbeit zu korrigieren.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglichten und mich zu jeder Zeit liebevoll unterstützt haben.